



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ**

---



*Διδακτορική Διατριβή*

**ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ β-  
ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΕΥΡΕΩΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ  
ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ  
*ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ***

υπό

**ΙΟΥΛΙΑΝΑ Π. ΚΡΙΣΤΟ**

Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος 2013

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2013

© 2013 Ιουλιάννα Κρίστο

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 2).

*Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (14<sup>η</sup>/5-12-2012 ΓΣΕΣ):*

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Σπυρίδων **Πουρνάρας**  
**(Επιβλέπων)** *Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Αθανάσιος **Τσακρής**  
*Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Αλέξανδρος **Δαπόντε**  
*Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα  
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος **Συρογιαννόπουλος**  
*Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας*
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Χρήστος **Χατζηχριστοδούλου**  
*Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα  
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Γεωργία **Βρυώνη**  
*Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό  
και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Βασιλική **Πιτυρίγκα**  
*Λέκτορας Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω ιδιαιτέρως στον Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, κ. Πουρνάρα Σπύρο, ο οποίος μου εμπιστεύτηκε το θέμα της διδακτορικής διατριβής αυτής. Η συμβολή του στην διεξαγωγή αυτής της μελέτης υπήρξε καθοριστική, καθώς η καθοδήγηση, οι υποδείξεις, η βοήθεια, η υπομονή και η στήριξή του σε όλα τα στάδια, υπήρξαν πολύτιμες για την εκπλήρωση αυτής της εργασίας. Θερμά ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού πανεπιστημίου Αθηνών κ. Αθανάσιο Τσακρή και τον κ. Αλέξανδρο Δαπόντε Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας των οποίων οι υποδείξεις και η καθοδήγηση συνέβαλαν σημαντικά στην εκπόνηση της διατριβής. Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Αντώνιο Μανιάτη, αφυπηρετήσαντα Καθηγητή Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, για την πολύτιμη συμβολή του στην διεκπεραίωση αυτής της διατριβής. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στους κ. Γεώργιο Συρογιαννόπουλο Καθηγητή Παιδιατρικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, κα. Γεωργία Βρυώνη Επίκουρο Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού πανεπιστημίου Αθηνών και την κα. Βασιλική Πιτυρίγκα Λέκτορα Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού πανεπιστημίου Αθηνών που με χαρά δέχθηκαν να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα όλους εκείνους με τους οποίους συνεργάστηκα και όσους με στήριξαν με την υπομονή τους και την αγάπη τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

*Λάρισα, 2013  
Ιουλιάννα Π. Κρίστο  
Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος*

**ΚΡΙΣΤΟ ΙΟΥΛΙΑΝΑ**  
**ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

Ημερομηνία Γέννησης: 08 Μαρτίου 1975

Διεύθυνση Κατοικίας: Παλαιολόγου 67-69  
Τ.Κ. 41223, Λάρισα  
Τηλέφωνο: 2413 011 853  
6932004125

e-mail: julikristo@hotmail.com

**ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ**

**2007–Σήμερα** Διδακτορική διατριβή στη Μοριακή Μικροβιολογία. Θέμα διδακτορικής διατριβής: “Φαινοτυπική και μοριακή μελέτη των β-λακταμασών ευρέως φάσματος και καρβαπενεμασών σε πολυανθεκτικά στελέχη Εντεροβακτηριακών”, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**2006** Πτυχίο Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ και  
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

- Σύμβαση ανάθεσης έργου από 01/07/2012 έως 31/12/2012 για την εκπόνηση του έργου «Μελέτη των πρωτεϊνών της μεμβράνης Gram (-) μικροβίων», Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα. Επιστημονικός Υπεύθυνος: Επίκουρος Καθηγητής Πουρνάρας Σπύρος.

- Σύμβαση ανάθεσης έργου από 01/05/2011 έως 30/08/2011 για την εκπόνηση του έργου «Βιοχημική και μοριακή μελέτη των ενζύμων που υδρολύουν τις καρβαπενέμες», Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα. Επιστημονικός Υπεύθυνος: Επίκουρος Καθηγητής Πουρνάρας Σπύρος.
- Σύμβαση ανάθεσης έργου από 01/04/2010 έως 30/04/2011 για την εκπόνηση του έργου «Μοριακή μελέτη ανθεκτικών μικροβίων που απομονώνονται από νοσοκομειακές λοιμώξεις», Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα. Επιστημονικός Υπεύθυνος: Επίκουρος Καθηγητής Πουρνάρας Σπύρος.
- Εργαζόμενη στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας από 17/07/2003 έως 12/07/2005 με το πρόγραμμα «Απόκτηση εργασιακής εμπειρίας σε φορείς του τομέα υγείας και πρόνοιας-STAGE 2003». Αντικείμενο απασχόλησης: Ερευνητικά πρωτόκολλα και διαγνωστικές μοριακές εξετάσεις όπως: ανίχνευση στο αίμα EBV, VZV, HSV ½ και CMV. Ανίχνευση HPV, χλαμυδίων, ουρεοπλάσματος και μυκοπλάσματος σε τραχηλικό επίχρισμα.

#### Ξένη Γλώσσα:

Αγγλικά (Certificate of Competency in English, Michigan 2004),

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Kristo I**, Pitiriga V, Poulou A, Zarkotou O, Kimouli M, Pournaras S, Tsakris A. Susceptibility patterns to extended-spectrum cephalosporins among *Enterobacteriaceae* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases using the updated Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria. *Int J Antimicrob Agents*. **2013**.S0924-8579(12): 00469-4.
2. Tsakris A, Poulou A, Markou F, Pitiriga V, Piperaki ET, **Kristo I**, Pournaras S. Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harboring CMY-31, VIM-1, and a New OXY-2-type variant in the community. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2011**. 55(7):3164-8.
3. Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, **Kristo I** and Tsakris A. Detection of the new metallo- $\beta$ -lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob. Chemother*. **2010**. 65: 1604–1607.

4. Pournaras S, **Kristo I**, Vrioni G, Ikonomidis A, Poulou A, Petropoulou D, Tsakris A. Characteristics of Meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. **2010**. 48(7):2601-4.
5. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, **Kristo I**, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A and Sofianou D. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2009**. 64: 348–352.
6. Tsakris A, Poulou A, **Kristo I**, Pittaras T, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Large dissemination of VIM-2-metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *J Clin Microbiol*. **2009**. 47(11): 3524-9.
7. Tsakris A, **Kristo I**, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. **2009**. 47(2): 362-7.
8. Tsakris A, **Kristo I**, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A and Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2008**. 62: 1257–1260.
9. Kontou M, Pournaras S, **Kristo I**, Ikonomidis A, Maniatis AN and Stathopoulos C. Molecular Cloning and Biochemical Characterization of VIM-12, a Novel Hybrid VIM-1/VIM-2 Metallo- $\beta$ -lactamase from a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate, Reveal Atypical Substrate Specificity. *Biochemistry*. **2007**. 46: 13170-13178.
10. Ikonomidis A, Tokatlidou D, **Kristo I**, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, Pournaras S, Maniatis AN. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a bla VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *J Clin Microbiol*. **2005**. 43(10):5344-7.
11. Pournaras S, Ikonomidis A, **Kristo I**, Tsakris A, Maniatis AN. CTX-M enzymes are the most common extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* in a tertiary Greek hospital. *J Antimicrob Chemother*. **2004**. 54(2): 574-5.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Poster in the 21<sup>TH</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), under the title: “Susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins among ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates according to the new CLSI recommendations”  
Milan, Italy, 7-10 May, 2011
- Poster in the 49<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Meeting (ICAAC) of American Society for Microbiology, under the title: “Investigation of Meropenem Heteroresistance in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*”  
San Francisco, CA, September, 2009
- Poster in the 6<sup>th</sup> European Congress of Chemotherapy (ECC) and Infection/24<sup>th</sup> Reunion Interdisciplinaire de Chimiotherapie Anti-Infectieuse, under the title: “Detection of a variant CTX-M3 extended spectrum beta-lactamase gene, in a community-acquired strain of *Escherichia coli*”  
Paris, France, 1-3 December, 2004
- Poster in the 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), under the title: “Evaluation of human papilloma virus PCR detection in urine and cervical swabs of patients attending a colposcopy unit: a viable screening alternative?”  
Copenhagen, Denmark, 2-5 April, 2005



**"ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ β-  
ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΕΥΡΕΩΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ  
ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ  
ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ"**

**ΙΟΥΛΙΑΝΑ ΚΡΙΣΤΟ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2013

***ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ***

1. **Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας**, *Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)*
2. **Δρ. Αθανάσιος Τσακρής**, *Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*
3. **Δρ. Αλέξανδρος Δαπόντε**, *Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

*Στην οικογένειά μου*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	14
ABSTRACT.....	17
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	19
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	20
1. <i>Εντεροβακτηριακά</i> .....	21
1.1 Ταξινόμηση και γενικά χαρακτηριστικά των <i>Εντεροβακτηριακών</i> .....	21
1.2 Δομή των <i>Εντεροβακτηριακών</i> .....	22
1.2.1 Κυτταρικό τοίχωμα .....	22
1.2.2 Έλυτρο.....	24
1.2.3 Μαστίγια.....	24
1.2.4 Κροσσοί.....	25
1.3 Ταυτοποίηση <i>Εντεροβακτηριακών</i> .....	25
1.4 Παθογένεια <i>Εντεροβακτηριακών</i> .....	26
1.5 Κλινικές εκδηλώσεις.....	26
1.5.1 Εξωεντερικές λοιμώξεις στον άνθρωπο .....	27
1.5.2 Εντερικές λοιμώξεις στον άνθρωπο.....	27
1.6 Ιατρικώς σημαντικά γένη <i>Εντεροβακτηριακών</i> .....	28
1.6.1 <i>Escherichia</i> .....	28
1.6.1.1 Παθοφυσιολογία .....	29
1.6.2 <i>Klebsiella</i> .....	32
1.6.3 <i>Enterobacter</i> .....	34
2. Μικροβιακή Αντοχή .....	35
2.1 Γενετική βάση της μικροβιακής αντοχής.....	35
2.2 Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής .....	38
3. β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	41
3.1 Πενικιλίνες.....	42
3.2 Κεφαλοσπορίνες.....	42
3.3 Καρβαπενέμες .....	44
3.4 Μονοβακτάμες .....	45
4. β-λακταμάσες και η ταξινόμησή τους .....	45
4.1 Λειτουργική ταξινόμηση β-λακταμασών .....	46
4.1.1 Ομάδα 1. Κεφαλοσπορινάσες.....	46
4.1.2 Ομάδα 2. β-λακταμάσες σερίνης.....	47
4.1.3 Ομάδα 3. Μετάλλο-β-λακταμάσες (MBLs) .....	50
4.1.4 β-λακταμάσες ομάδας 4 .....	51
4.2 Μοριακή ταξινόμηση β-λακταμασών .....	52
4.3 β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (ESBLs) .....	53
4.3.1 Τύποι των ESBL .....	54
4.3.1.1 SHVESBLs.....	54
4.3.1.2 TEM ESBLs.....	56
4.3.1.3 CTX-MESBLs .....	57
4.3.1.4 OXAESBLs .....	62
4.3.2 Εργαστηριακή διάγνωση των ESBLs .....	63
4.3.3 Επιδημιολογία των ESBLs .....	65

<b>4.4 Καρβαπενεμάσες</b> .....	70
4.4.1 Καρβαπενεμάσες τάξης B (Μεταλλο-β-λακταμάσες) .....	70
4.4.1.2 Μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM.....	73
4.4.2 KPC καρβαπενεμάσες.....	74
4.4.3 Ανίχνευση καρβαπενεμασών.....	76
4.4.4 Επιδημιολογία καρβαπενεμασών.....	78
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	80
<b>1. Υλικά και μέθοδοι</b> .....	81
1.1 Βακτηριακά Στελέχη .....	81
1.2 Καλλιέργεια και Απομόνωση .....	81
1.3 Μικροβιακή ταυτοποίηση .....	82
<b>1.4. Μελέτη διασποράς των ESBLs στην Ελληνική επικράτεια και επίδρασης των νέων ερμηνευτικών κριτηρίων του CLSI στον έλεγχο ρουτίνας στελεχών που παράγουν ESBL</b> .....	82
1.4.1 Έλεγχος επιβεβαίωσης φαινοτύπου ESBL σύμφωνα με τις οδηγίες του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI).....	82
1.4.2 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Προσδιορισμός της MIC με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ .....	83
1.4.3 Εξαγωγή του μικροβιακού DNA .....	84
1.4.4 Ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμασών με τη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	85
1.4.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης.....	88
1.4.6 Καθαρισμός των προϊόντων PCR και αλληλούχιση.....	88
<b>1.5 Ανίχνευση της KPC καρβαπενεμάσης με τη νέα μέθοδο δίσκων βορονικού οξέος</b> .....	90
1.5.1 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά .....	90
1.5.2 Φαινοτυπικός έλεγχος για την παρουσία καρβαπενεμάσης .....	90
1.5.3 Φαινοτυπικός έλεγχος για την παρουσία μεταλλο-β- λακταμάσης (MBL) .....	91
1.5.4 Φαινοτυπικός έλεγχος με την νέα μέθοδο δισκίων βορονικού οξέος.....	92
1.5.5 Ενίσχυση γονιδίων β-λακταμασών με την μέθοδο της PCR.....	92
<b>1.6 Αξιολόγηση της νέας μεθόδου βορονικού οξέος</b> .....	93
1.6.1 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά .....	93
1.6.2 Μοριακός έλεγχος των γονιδίων αντοχής με την μέθοδο της PCR.....	94
1.6.3 Φαινοτυπικός έλεγχος με τα δισκία βορονικού οξέος .....	94
1.6.4 Προσδιορισμός ευαισθησίας, ειδικότητας θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας του τεστ βορονικού οξέος.....	94
<b>1.7 Χαρακτηριστικά της ετερογενούς αντοχής στη μεροπενέμη σε στελέχη <i>K. pneumoniae</i> θετικές για KPC καρβαπενεμάση</b> .....	95
1.7.1 Βακτηριακά στελέχη και έλεγχοι ευαισθησίας σε αντιβιοτικά .....	95
1.7.2 Πληθυσμιακή ανάλυση και έλεγχος σταθερότητας της ετερογένειας.....	96
1.7.3 Ποσοτική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου <i>bla<sub>KPC</sub></i> με την PCR αντίστροφης τρανσκριπτάσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR).....	97
1.7.4 Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Bactericidal Assays) .....	98
<b>1.8 Ανίχνευση νέας μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-19 σε στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> που παρήγαγε συγχρόνως τις β-λακταμάσες KPC-2, CMY-2 ΚΑΙ CTX-M-15.</b> .....	98
1.8.1 Βακτηριακά στελέχη και φαινοτυπικοί έλεγχοι .....	98
1.8.2 Έλεγχος γονιδίων αντοχής με PCR.....	99
<b>1.9 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12</b> .....	99
1.9.1 Κλωνοποίηση γονιδίου της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12 .....	99
1.9.2 Καθαρισμός της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης .....	103

1.9.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12 .....	108
<b>2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>111</b>
2.1 Διασπορά των ESBLs στην Ελληνική επικράτεια. Επίδραση των νέων ερμηνευτικών κριτηρίων της CLSI στον έλεγχο ρουτίνας στελεχών που παράγουν ESBL .....	111
2.1.1 Η κατανομή των γονιδίων ESBLs ανάμεσα στα κλινικά στελέχη υπό μελέτη .....	111
2.1.2. Η κατανομή των γονιδίων ESBLs ανάμεσα στα είδη <i>Εντεροβακτηριακών</i> .....	111
2.1.3 Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και τα επίπεδα ευαισθησίας ανάμεσα στα στελέχη <i>Εντεροβακτηριακών</i> που παρήγαγαν ESBLs .....	113
2.1.4 Τα προφίλ ευαισθησίας ανάμεσα στις ESBLs διαφορετικού τύπου .....	114
2.2 Αποτελέσματα ανίχνευσης KPC καρβαπενεμάσης με τη νέα μέθοδο δισκίων βορονικού οξέος .....	114
2.3 Αποτελέσματα αξιολόγησης της νέας μεθόδου δίσκων βορονικού οξέος .....	116
2.3.1 Αποτελέσματα ελέγχου αντιμικροβιακής ευαισθησίας (MICs) .....	116
2.3.2 Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου για τα γονίδια β-λακταμασών .....	118
2.3.3 Αποτελέσματα ελέγχου με τη μέθοδο δισκίων βορονικού οξέος. Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική και αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου .....	118
2.4 Αποτελέσματα μελέτης ετερογενούς αντοχής στη μεροπενέμη σε στελέχη <i>K. pneumoniae</i> που παράγουν KPC καρβαπενεμάση .....	121
2.4.1 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής ευαισθησίας των βακτηριακών στελεχών .....	121
2.4.2 Αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάλυσης και qRT-PCR .....	122
2.4.3 Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Time Killing assays) .....	123
2.5 Ανίχνευση νέας μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-19 σε στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> που παρήγαγε συγχρόνως τις β-λακταμάσες KPC-2, CMY-2 και CTX-M-15. ....	124
2.6 Βιοχημικός χαρακτηρισμός νέας «υβριδικής» μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12 .....	126
2.6.1 Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου VIM-12 .....	126
2.6.2 Υπερέκφραση, καθαρισμός και ανίχνευση της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης .....	128
2.6.3 Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης της VIM-12 .....	129
2.6.4 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12 .....	131
2.6.5 Επίδραση συνδυασμού αντιβιοτικών στην δράση της VIM-12 και υπολογισμός των σταθερών αναστολής .....	133
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>137</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>142</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ .....</b>	<b>160</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη αυτή ξεκίνησε με αρχικό σκοπό τη διερεύνηση των β-λακταμασών ευρέως φάσματος (Extended-Spectrum Beta-Lactamases, ESBL) στον Ελληνικό χώρο.

Οι ESBLs προκαλούν σοβαρά προβλήματα αντοχής στο νοσοκομειακό περιβάλλον αλλά τα τελευταία χρόνια είναι αρκετά συχνές και σε εξωνοσοκομειακά βακτήρια. Παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του '80 και έκτοτε η διασπορά τους είναι μεγάλη. Επίσης, ο αριθμός των παραγώγων των ESBL έχει αυξηθεί σταθερά από το 1983 δείχνοντας την γρήγορη εξέλιξή τους και περισσότερα από 300 διαφορετικά παράγωγά τους είναι γνωστά μέχρι σήμερα. Οι ESBL έχουν ταξινομηθεί σε 9 δομικά εξελικτικές οικογένειες με βάση την σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας τους (TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES και OXA). Οι περισσότερες ESBL περιέχουν μία σερίνη στο ενεργό τους κέντρο και ανήκουν στη μοριακή τάξη A κατά Ambler, που ταξινομεί τις β-λακταμάσες με βάση την ομολογία των αμινοξικών τους αλληλουχιών. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Bush *et al.* το 1995, που χωρίζει τις β-λακταμάσες ανάλογα με τις βιοχημικές τους ιδιότητες και το υδρολυτικό τους φάσμα, οι ESBL χαρακτηρίζονται ως β-λακταμάσες που υδρολύουν τις οξυΐμινο-κεφαλοσπορίνες, αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και ανήκουν στην ομάδα 2be.

Από τις ESBL, οι πιο συνηθισμένες είναι οι τύπου TEM, SHV και CTX-M στις οποίες μια ή περισσότερες αντικαταστάσεις αμινοξέων είναι υπεύθυνες για την επέκταση στην υδρολυτική ειδικότητά τους, με υποστρώματα που περιλαμβάνουν τις οξυΐμινο-κεφαλοσπορίνες και τις μονοβακτάμες. Η εξελικτική τους επιτυχία οφείλεται στην αποτελεσματική υδρολυτική δράση τους και στο γεγονός ότι τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε πλασμίδια που έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται οριζόντια ανάμεσα σε διάφορα είδη εντεροβακτηριακών.

Οι ESBL έχουν ένα ευρύ φάσμα υδρολυτικής ικανότητας που περιλαμβάνει πολλές β-λακτάμες εκτεταμένου φάσματος. Οι καρβαπενέμες και οι κεφαμικίνες έχουν παραμείνει ανθεκτικές σ' αυτές τις β-λακταμάσες, ενώ οι αναστολείς β-λακταμασών (όπως το κλαβουλανικό οξύ και η ταζοβακτάμη) έχουν διατηρήσει μία πολύ αποτελεσματική ανασταλτική δράση έναντι των ESBL.

Στον Ελληνικό χώρο, παρόλο που είναι συχνά τα κλινικά στελέχη που παράγουν ESBL και η αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά εκτεταμένου φάσματος αυξάνεται συνεχώς, δεν είχε γίνει την τελευταία δεκαετία κάποια συστηματική έρευνα όσον

αφορά την επίπτωση των ESB� στα νοσοκομειακά στελέχη εντεροβακτηριακών. Έτσι, θα παρουσίαζε ενδιαφέρον μία μελέτη που θα περιελάμβανε ένα μεγάλο αριθμό κλινικών στελεχών που παράγουν ESB� από διάφορα Ελληνικά νοσοκομεία, με σκοπό την καταγραφή των πιο συχνών ESB�, την κατανομή τους ανάμεσα στα διάφορα στελέχη και τις επιδημιολογικές διαφορές που μπορούν να προκύψουν σε σύγκριση με άλλες περιοχές.

Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης προέκυψαν και άλλα σοβαρά ζητήματα που αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας και προστέθηκαν στον αρχικό σκοπό της μελέτης, όπως: η εμφάνιση στον Ελληνικό χώρο καινούργιων ενζύμων, των KPC καρβαπενεμασών και η απομόνωση βακτηριακών στελεχών ιδιαίτερου ενδιαφέροντος που παρήγαγαν νέες και σημαντικές β-λακταμάσες. Έτσι, η διεκπεραίωση αυτής της μελέτης βασίστηκε σε τέσσερις άξονες:

1. Προσδιορισμός των τύπων ESB� που επικρατούν στην Ελλάδα.
2. Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδων φαινοτυπικής ανίχνευσης και χαρακτηρισμού νεοεμφανισθέντων β-λακταμασών, όπως οι KPC.
3. Φαινοτυπική και μοριακή διερεύνηση στελεχών που απομονώθηκαν στη διάρκεια της μελέτης και που παράγουν νέες και σημαντικές β-λακταμάσες.
4. Βιοχημικός χαρακτηρισμός νέας β-λακταμάσης, της VIM-12, σε πολυανθεκτικά βακτήρια με νέους φαινοτύπους.

Έτσι, στην μελέτη αυτή διερευνήθηκε η διασπορά των ESB�s στον Ελληνικό χώρο και προσδιορίστηκαν οι επικρατέστεροι τύποι. Ο CTX-M τύπος ESB�, που είναι πλέον ο πιο συχνός παγκοσμίως, βρέθηκε να επικρατεί και στη συλλογή μας, με το αλλήλιο CTX-M-15 να είναι το επικρατέστερο ανάμεσα στις *K. pneumoniae* και το αλλήλιο CTX-M-3 να επικρατεί ανάμεσα στις *E. coli*. Οι SHV-5 ESB�s βρέθηκαν κυρίως σε στελέχη *E. cloacae* και *K. pneumoniae*. Οι ESB�-θετικές *E. coli* ήταν πιο ευαίσθητες στην κεφταζιδίμη απ' ό,τι οι *K. pneumoniae*, λόγω του CTX-M-3 αλληλίου που προσδίδει χαμηλότερα επίπεδα αντοχής στην κεφταζιδίμη σε σχέση με το CTX-M-15 και SHV-5.

Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση των νέων ορίων ευαισθησίας που προτάθηκαν από το CLSI (Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων) το 2010 και παρατηρήθηκε αυξημένη ευαισθησία, κυρίως στην κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη.

Αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε η καινούργια μέθοδος με τη χρήση δισκίων βορονικού οξέος για την ανίχνευση KPC ενζύμων και εκτιμήθηκε ως μια απλή και φθηνή μέθοδος με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα που με ακρίβεια μπορεί να

διακρίνει στελέχη που παράγουν αυτά τα ένζυμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται πλέον με επιτυχία σε όλα τα Ελληνικά νοσοκομεία αλλά και διεθνώς.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC περιέχουν ετερογενείς υποπληθυσμούς που αναπτύσσονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μεροπενέμης γι' αυτό και το αντιβιοτικό αυτό δεν θανάτωσε ικανοποιητικά *in vitro* αυτά τα βακτήρια. Ο συνδυασμός όμως μεροπενέμης με γενταμικίνη βρέθηκε ότι θανατώνει αποτελεσματικά και γρήγορα τα βακτήρια αυτά.

Διερευνήθηκαν τέλος οι μηχανισμοί αντοχής σε ενδιαφέροντα στελέχη, όπως ένα πολυανθεκτικό στέλεχος *K. pneumoniae* που βρέθηκε να φέρει μια καινούργια μεταλλο-β-λακταμάση, την VIM-19, μαζί με άλλα γονίδια β-λακταμασών (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> και *bla*<sub>KPC-2</sub>) και ένα στέλεχος *K. pneumoniae* με την καινούργια μεταλλο-β-λακταμάση VIM-12, της οποίας έγινε βιοχημικός χαρακτηρισμός και προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι.



## ABSTRACT

The primary purpose of this study was to investigate the distribution of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in Greece.

ESBLs are the cause of severe resistance problems in nosocomial setting, but recently they are very frequent in the community as well. The first ESBL was detected in early '80s and since then they have spread worldwide. The number of ESBL derivatives has been increased steadily since 1983 showing their rapid evolution, with more than 300 different ESBL derivatives to be known to date. ESBLs are classified into 9 structurally evolutionary families based on the homology of their amino acid sequences (TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES και OXA). Most ESBLs have a serine in their active site and belong to the Ambler molecular class A. According to the classification of Bush *et al.* in 1995, that classifies  $\beta$ -lactamases based on their biochemical properties and their hydrolytic spectrum, ESBLs are characterized as  $\beta$ -lactamases that hydrolyze oxyimino-cephalosporins, are inhibited by clavulanic acid and belong to 2be group.

The most frequent ESBLs are TEM-, SHV- and CTX-M-type ESBLs which have derived by one or more amino acid substitutions that are responsible for the expansion in the substrate specificity, including oxyimino-cephalosporins and monobactams. Their evolutionary success is due to their effective hydrolytic activity and to the fact that these genes are located in plasmids which have the ability to move horizontally between different species of Enterobacteriaceae.

ESBLs have an extended spectrum of hydrolytic activity that includes extended spectrum  $\beta$ -lactams but not carbapenems and cephamycins, while remain susceptible to  $\beta$ -lactamases inhibitors (like clavulanic acid and tazobactam).

In Greece, although the clinical strains which produce ESBLs are frequent and the resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactams is continuously increasing, there has not been conducted any systematic research on the prevalence of ESBLs in nosocomial strains of *Enterobacteriaceae* for the last decade. So, the study of a large number of clinical strains which produce ESBLs from different Greek hospitals in order to record the most common ESBLs, their distribution among different strains and the epidemiological differences with other regions would be of interest.

During this study, there were also other serious issues that emerged and were subject to investigation, such as: the emergence in the Greek area of new enzymes,

KPC carbapenemases; isolation of strains of particular interest that produced new and important  $\beta$ -lactamases. So, the execution of this study was based on four axes:

1. Determination of ESBL-types dominating in Greece.
2. Development and estimation of phenotypic methods for detection and characterization of new  $\beta$ -lactamases, such as the KPC enzymes.
3. Phenotypic and molecular investigation of strains producing new and important  $\beta$ -lactamases and were isolated during the study.
4. Biochemical characterization of new  $\beta$ -lactamases in multiresistant bacteria with new phenotypes (characterization of VIM-12 metallo- $\beta$ -lactamase).

In this study, there was investigated the distribution of ESBLs in the Greek region and the dominant types were determined. The CTX-M-type, the most frequently observed worldwide, was found to be the dominant type in our collection as well, with CTX-M-15 allele to be the most dominant among *K. pneumoniae* and CTX-M-3 allele among *E. coli*. SHV-5 ESBL was found mostly in *E. cloacae* and *K. pneumoniae*. ESBL-positive *E. coli* isolates were more susceptible to ceftazidime than *K. pneumoniae* due to the CTX-M-3 allele which provides lower levels of resistance to this antibiotic compared to CTX-M-15 and SHV-5. Also, the impact of the new breakpoints that were set by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in 2010 was studied and an increased susceptibility mostly to ceftazidime and cefepime was observed.

In addition, a new method using boronic acid disks was developed and evaluated for the detection of KPC enzymes. It was estimated that it is simple, cheap and highly sensitive and specific, detecting accurately KPC producers. This method is now used successfully in all Greek hospital and internationally.

It was observed that KPC-producing strains of *K. pneumonia* contain heterogeneous subpopulations which grow at higher meropenem concentrations hence this antibiotic did not kill sufficiently these bacteria *in vitro*. However, the combination of meropenem and gentamicin killed efficiently and quickly these bacteria.

In this study, there were also investigated strains of particular interest such as: one multiresistant strain of *K. pneumoniae* that was found to harbor a new metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-19, along with other  $\beta$ -lactamase genes (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> και *bla*<sub>KPC-2</sub>); and one strain of *K. pneumoniae* which harbored the new VIM-12 metallo- $\beta$ -lactamase that was biochemically characterized by determining its kinetic parameters.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα Gram-αρνητικά παθογόνα η παραγωγή β-λακταμασών παραμένει ο πιο σημαντικός παράγοντας αντοχής στις β-λακτάμες (Livermore DM, 2003). Οι β-λακταμάσες είναι βακτηριακά ένζυμα που αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά υδρολύοντάς τα. Μία ομάδα β-λακταμασών, οι β-λακταμάσες ευρέως φάσματος (ESBLs), έχουν την ικανότητα να υδρολύουν και να προκαλούν αντοχή σε διάφορους τύπους των νεότερων β-λακταμικών αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος (ή τρίτης-γενιάς όπως: κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη) και μονοβακταμών (όπως η αζτρεονάμη), αλλά όχι των κεφαμυκινών (όπως κεφοξιτίνη και κεφοτετάνη) και των καρβαπενεμών (όπως η ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη) (Bradford PA, 2001). Οι μικροοργανισμοί που παράγουν ESBL παραμένουν μία σημαντική αιτία για θεραπευτική αποτυχία μετά από χρήση κεφαλοσπορινών, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σοβαρές συνέπειες στον έλεγχο λοιμώξεων (Paterson DL, 2005). Οι συχνότερες ESBL στην νοσοκομειακή πράξη ανήκουν στους τύπους TEM, SHV και CTX-M (Paterson DL, 2006), (Paterson DL, 2005). Οι *Klebsiella pneumoniae* και *Escherichia coli* παραμένουν οι κύριοι μικροοργανισμοί που παράγουν ESBL και απομονώνονται παγκοσμίως, παρόλο που τα ένζυμα αυτά έχουν βρεθεί και σε διάφορα άλλα μέλη της οικογένειας των *Εντεροβακτηριακών* και σε ορισμένα αζυμοτικά (Jacoby GA, 2005).

Μία πρόσφατη αναφορά συμπεριέλαβε τους δύο αυτούς μικροοργανισμούς στα έξι ανθεκτικά μικρόβια για τα οποία χρειάζονται καινούργιες θεραπείες (Talbot GHZ, 2006).

Ο μεγάλος επιπολασμός των *Εντεροβακτηριακών* που παράγουν ESBL είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη χρήση των καρβαπενεμών, οι οποίες είναι δραστικές ενάντια σ' αυτούς τους οργανισμούς. Με τη σειρά του αυτό έχει οδηγήσει στην εμφάνιση και αύξηση της αντοχής στις καρβαπενέμες ανάμεσα στα *Εντεροβακτηριακά*, κυρίως μέσω υδρολυτικών ενζύμων (καρβαπενεμάσες) οι οποίες χωρίζονται λειτουργικά στις εξαρτώμενες από σερίνη (όπως KPC, OXA-48) και τις μεταλλο-λακταμάσες που συμπεριλαμβάνουν κάποιες από τις πιο σημαντικές β-λακταμάσες, όπως οι VIM, IMP, NDM (Pitout JDD, 2008).

Μείζονος σημασίας είναι η συνύπαρξη πολλαπλών γονιδίων ESBL και καρβαπενεμασών καθώς και άλλων παραγόντων αντοχής σε μεταθετά στοιχεία που

μαζί με τη γενετική πλαστικότητα των *Εντεροβακτηριακών*, έχει οδηγήσει στην ευρεία μεταφορά αυτών των στοιχείων μέσα και μεταξύ των ειδών και την εμφάνιση οργανισμών με αντοχή, πρακτικά, σε όλα τα αντιβιοτικά (Bush K, 2010), (Gazin M, 2012).

## 1. Εντεροβακτηριακά

Τα *Εντεροβακτηριακά* είναι μία μεγάλη οικογένεια Gram-αρνητικών βακτηρίων που συμπεριλαμβάνει οργανισμούς οι οποίοι βρίσκονται στη γη, το νερό και τη βλάστηση, και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα των περισσότερων ζώων, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Τα *Εντεροβακτηριακά* είναι τα πιο συχνά βακτηριακά στελέχη που απομονώνονται από τα κλινικά δείγματα. Κάποια μέλη της οικογένειας των *Εντεροβακτηριακών* σχετίζονται πιο συχνά με ασθένειες στον άνθρωπο (όπως: *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* spp.) από άλλα (όπως: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp.). Τα δεύτερα είναι μέλη της φυσιολογικής συμβιωτικής χλωρίδας, που σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες σε ανθρώπους, με ήπια συμπτώματα έως και σοβαρές λοιμώξεις με θανατηφόρα σηψαιμία. Άλλα βακτήρια, της οικογένειας αυτής, που προκαλούν ασθένειες συμπεριλαμβάνουν τα *Enterobacter*, *Serratia* και *Citrobacter*.

### 1.1 Ταξινόμηση και γενικά χαρακτηριστικά των *Εντεροβακτηριακών*

Η οικογένεια αυτή είναι η μόνη αντιπροσωπευτική της τάξης των Enterobacteriales, κλάσης Gammaproteobacteria και φύλου Proteobacteria. Συμπεριλαμβάνει πολλά γένη με εκατοντάδες είδη.

Τα μέλη της οικογένειας των *Εντεροβακτηριακών* έχουν αρκετές κοινές ιδιότητες. Είναι όλα Gram-αρνητικοί, αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι, μη σπορογόνοι βάκιλοι σχετικά μικρού μεγέθους (2-3  $\mu\text{m}$  x 0,4-0,6  $\mu\text{m}$ ).

Αναπτύσσονται σε πεπτόνη ή μέσο με εκχυλίσματα κρέατος χωρίς την προσθήκη χλωριούχου νατρίου ή άλλων συμπληρωμάτων; αναπτύσσονται καλά σε MacConkey

άγαρ, μεταβολίζουν τη D-γλυκόζη και άλλα σάκχαρα με αποτέλεσμα να είναι ικανά να αναπτύσσονται σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, παράγουν καταλάση, αλλά όχι οξειδωτικά ένζυμα, μετατρέπουν τα νιτρικά σε νιτρώδη, περιέχουν το κοινό εντεροβακτηριακό αντιγόνο και το DNA τους περιέχει ποσοστό 39 – 59% G + C. Είναι ανθεκτικοί στα χολικά άλατα (και γι' αυτό επιζούν στο ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο). Αναπτύσσονται σ' ένα ευρύ φάσμα συνθηκών θερμοκρασίας και pH. Τα περισσότερα *Εντεροβακτηριακά* είναι κινητά με περίτριχα μαστίγια, αλλά κάποια (π.χ. *Shigella* και *Klebsiella*) είναι ακίνητα. Διαφοροποιούνται εύκολα εργαστηριακά από τις βιοχημικές, αντιγονικές και γενετικές διαφορές τους. Επίσης, ποικίλουν από άποψη ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.

## 1.2 Δομή των *Εντεροβακτηριακών*

Τα σημαντικά δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των *Εντεροβακτηριακών* είναι (**Εικόνα 1**):

- Η εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη
- Η στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης
- Η εξωτερική μεμβράνη αποτελούμενη από δύο στοιβάδες: μία στοιβάδα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών και μία εξωτερική στοιβάδα λιποπολυσακχαριτών (LPS).

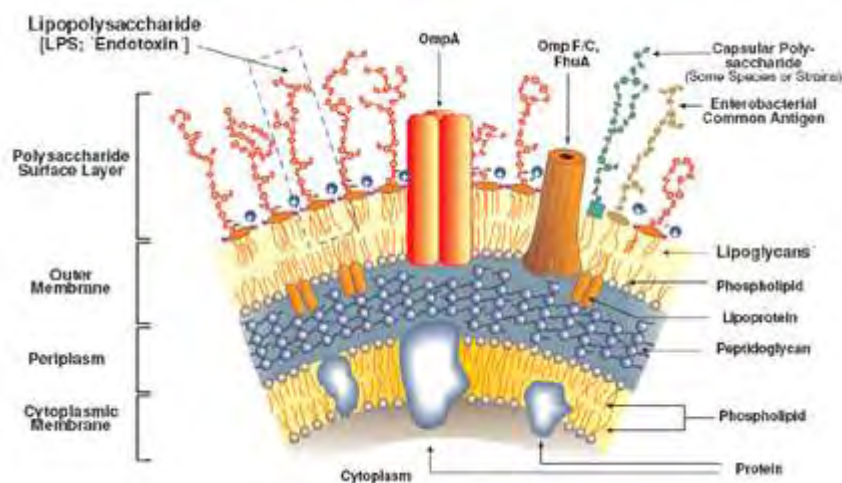
Πολλοί οργανισμοί, όπως *Klebsiella spp.* και ένας αριθμός από στελέχη *E.coli*, διαθέτουν μία επιπλέον στοιβάδα, το έλυτρο.

Μερικά *Εντεροβακτηριακά* διαθέτουν μαστίγια, πρωτεϊνικές δομές που δίνουν κίνηση στα βακτήρια. Επιπλέον, η παρουσία κροσσών, επίσης πρωτεϊνικής φύσης, είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην προσήλωση ή την προσκόλληση στο βλεννογόνο.

### 1.2.1 Κυτταρικό τοίχωμα

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι σημαντικό κομμάτι του κυτταρικού περιβλήματος, είναι το όριο μεταξύ κυτταροπλάσματος και περιβάλλοντος, και είναι πρωτίστως υπεύθυνη για τη ρύθμιση της ροής θρεπτικών συστατικών και προϊόντων μεταβολισμού μέσα και έξω από το κύτταρο. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη

συμμετέχει στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό του βακτηρίου. Τα χημικά συστατικά της πεπτιδογλυκάνης, LPS και φωσφολιπιδίων συντίθενται από ένζυμα μέσα σ' αυτή την μεμβράνη (Osborn MJ, 1972).



**Εικ. 1** Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο λιπιδικών διπλοστοιβάδων, την εξωτερική και την εσωτερική ή κυτταροπλασματική μεμβράνη, οι οποίες διαχωρίζονται από τον περιπλασμικό χώρο που περιέχει το τρισδιάστατο δίκτυο της πεπτιδογλυκάνης (Alexander C, 2001).

Η πεπτιδογλυκάνη σχηματίζει μία λεπτότερη στοιβάδα στα Gram-αρνητικά βακτήρια και αποτελείται από ένα δίκτυο στο οποίο γραμμικές αλυσίδες αμινοσακχάρων που περιέχουν εναλλασσόμενα κατάλοιπα N-ακετύλ-γλυκοζαμίνης και N-ακετύλ-μουραμικού οξέος συνδέονται σε τετραπεπίδια (Osborn MJ, 1969). Η στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης διατηρεί το σχήμα των βακτηρίων (Schleifer KH, 1972).

Ο περιπλασμικός χώρος βρίσκεται μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης. Μέσα σ' αυτόν εκτελείται ένας αριθμός διεργασιών που είναι ζωτικές για την ανάπτυξη και την βιωσιμότητα του κυττάρου. Αλλαγές στην εξωτερική μεμβράνη ή στους LPS επιτρέπουν την απελευθέρωση των περιπλασμικών ενζύμων και δεσμευτικών πρωτεϊνών, που παίζουν ρόλο στην προστασία και την αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων και άμυνας του ξενιστή (Oliver DB, 1996).

Η εξωτερική μεμβράνη των *Εντεροβακτηριακών* σχηματίζεται από μία ασύμμετρη διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων (Lugtenberg B, 1983) και LPS (Lugtenberg B, 1983), (Revees P, 1994). Τα υδρόφοβα μέρη των μορίων LPS βρίσκονται προς το

περιβάλλον, ενώ τα υδρόφιλα μέρη αλληλεπιδρούν με τα υδρόφιλα μέρη των φωσφολιπιδίων. Τα μόρια LPS αποτελούνται από τρεις περιοχές: την ειδική αλυσίδα πολυσακχαριδίου-O, τον πυρήνα και το λιπίδιο-A. Το ειδικό πολυσακχαρίδιο-O είναι χημικά μοναδικό για κάθε τύπο οργανισμού και προσδίδει ορολογική ιδιαιτερότητα σε έναν οργανισμό. Αποτελείται από 20-40 επαναληπτικές μονάδες ολιγοσακχαριδίων που το καθένα περιέχει από δύο ως επτά διαφορετικά μονοσακχαρίδια διασυνδεδεμένα με γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η περιοχή του πυρήνα, που παρουσιάζει μικρότερη μεταβλητότητα σε σχέση με την ειδική αλυσίδα-O και είναι συχνά ταυτόσημη σε μεγάλες ομάδες Gram-αρνητικών βακτηρίων, περιέχει δεοξυ-σάκχαρο, 2-κετο-δεοξυτονικό οξύ και επτόζη. Ο πυρήνας συνδέει την αλυσίδα πολυσακχαριδίου και το λιπίδιο-A. Το λιπίδιο-A είναι η πιο διατηρημένη περιοχή των λιποπολυσακχαριτών και η βασική δομή είναι ίδια σε διάφορα Gram-αρνητικά βακτήρια. Το λιπίδιο-A είναι υπεύθυνο για τις βιολογικές ιδιότητες της ενδοτοξίνης.

### 1.2.2 Έλυτρο

Δύο τύποι πολυσακχαριδίων του ελύτρου έχουν βρεθεί στα *Εντεροβακτηριακά*. Το αντιγόνο M (αντιγόνο βλεννογόνου) παράγεται από τα περισσότερα εντερικά βακτήρια, πιθανότατα για προστασία από την ξήρανση. Το αντιγόνο M δεν είναι ειδικό και ορολογικά δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ διάφορων μικρο-οργανισμών. Σε αντίθεση, τα πολυσακχαρίδια αντιγόνου K έχουν δομές ειδικές για κάθε ορότυπο μέσα σε ένα είδος και πιθανότατα βοηθούν αυτά τα βακτήρια να αποφύγουν την φαγοκύτωση (Jann K, 1982), (Orskov F, 1992).

### 1.2.3 Μαστίγια

Πολλά μέλη των *Enterobacteriaceae* διαθέτουν δομές πρωτεϊνικής φύσεως που αποκαλούνται μαστίγια και παρέχουν στα βακτήρια κινητικότητα (Macnab RM, 1996). Τα μαστίγια περιέχουν το θερμοευαίσθητο αντιγόνο H το οποίο υπερισχύει του αντιγόνου-O. Γι' αυτό για την αντιδραστικότητα του αντιγόνου-O χρειάζεται πρώτα να γίνει αποδιάταξη του αντιγόνου H με θέρμανση ή με τη χρήση οξέος ή αλκοόλης (Orskov F, 1992).



### 1.2.4 Κροσσοί

Η παρουσία κροσσών στα βακτήρια αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για την προσήλωση ή την προσκόλληση στο βλεννογόνο του πεπτικού, αναπνευστικού ή ουρογεννητικού σωλήνα και στα ερυθροκύτταρα (προκαλώντας αιμοσυγκόλληση). Αυτές οι προσκολλητικές ιδιότητες των βακτηρίων που φέρουν κροσσούς παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στο βακτηριακό αποικισμό των επιθηλιακών επιφανειών και ως εκ τούτου αναφέρονται ως παράγοντες αποικισμού (Low D, 1996).

## 1.3 Ταυτοποίηση *Εντεροβακτηριακών*

Τα μέλη από τα περισσότερα γένη των *Εντεροβακτηριακών* σχηματίζουν αποικίες τύπου κολοβακτηριδίων σε απλό μέσο (οι αποικίες είναι κυκλικές με διάμετρο 1-3 χλ. και κάνουν μια χαμηλή καμπύλη, με λεία επιφάνεια, άχρωμες έως γκρι και ημιδιαφανείς).

Για την απομόνωση των *Εντεροβακτηριακών* από δείγματα που περιέχουν μικτή χλωρίδα χρησιμοποιούνται διάφορα μέσα: μη εκλεκτικά υλικά (π.χ. αιματούχο άγαρ), εκλεκτικά ή διαχωριστικά υλικά (όπως MacConkey άγαρ, *Salmonella-Shigella* άγαρ) και εμπλουτισμένοι ζωμοί που ενισχύουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων ενώ αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων, ανεπιθύμητων βακτηρίων.

Στο MacConkey άγαρ, που περιέχει λακτόζη, οι αποικίες μπορεί να είναι ροζ, υποδεικνύοντας ότι οι οργανισμοί ζυμώνουν τη λακτόζη γρήγορα, ή ωχρές, υποδεικνύοντας ότι οι οργανισμοί δεν ζυμώνουν τη λακτόζη ή ότι προκαλούν αργή ζύμωση μετά από μερικές μέρες επώασης (Brenner DJ, 1984). Η διαδικασία αυτή κάνει δυνατή μία άμεση πιθανή διάκριση μεταξύ αποικιών. Τα ευρήματα αυτά πρέπει να επιβεβαιώνονται και από άλλα τεστ.

Οι διαφορές στις βιοχημικές ιδιότητες αποτελούν το κύριο μέσο διαφοροποίησης μεταξύ γενών και ειδών (Barrow GJ, 1993). Ένας αριθμός μεθόδων ταυτοποίησης υπάρχει άμεσα διαθέσιμος από εμπορικές πηγές (όπως: API-20E system–bioMérieux, Hertogenbosch, The Netherlands). Οι μέθοδοι αυτές παρέχουν ένα εύρος απλών βιοχημικών τεστ και το βιοχημικό προφίλ για ένα υψηλό ποσοστό βακτηριακών ειδών μπορεί να ληφθεί μέσα σε 24 ώρες επώασης στους 37°C (D' Amato RF, 1991). Το

βιοχημικό προφίλ μεταφράζεται σε έναν αριθμητικό κώδικα, ο οποίος μπορεί να διαβαστεί από ένα δείκτη προφίλ (profile index). Για ασυνήθιστους οργανισμούς υπάρχουν υπηρεσίες ταυτοποίησης βασισμένες σε υπολογιστές. Το γρήγορο σύστημα API-20E επιτρέπει την ταυτοποίηση των *Εντεροβακτηριακών* μέσω ανίχνευσης προσχηματισμένων ενζύμων στο εναιώρημα του υπό έλεγχο οργανισμού και δίνει αποτέλεσμα σε 4 ώρες. Πλήρως αυτοματοποιημένα συστήματα, όπως το Vitek2 (bioMérieux) και το Phoenix (BD Diagnostic Systems Europe, France) είναι επίσης διαθέσιμα.

Επίσης, μοριακές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κλινικούς σκοπούς για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση παθογόνων *Εντεροβακτηριακών* έτσι ώστε να μπορούν να αντιμετωπιστούν καλύτερα οι ασθενείς, όπως και για επιδημιολογικές μελέτες.

## 1.4 Παθογένεια *Εντεροβακτηριακών*

Η φυσική άμυνα του ξενιστή περιορίζει την πλειονηφία των βακτηριακών αλληλεπιδράσεων. Συνεπώς, οι λοιμώξεις που προκαλούνται από μέλη της οικογένειας *Εντεροβακτηριακών* καθορίζονται από διάφορους παράγοντες τοξικότητας σε παθογόνα στελέχη και από την κατάσταση ανοσίας του ξενιστή. Στις περισσότερες λοιμώξεις προηγούνται ο αποικισμός του βλεννογόνου και η προσκόλληση πάνω του, η αποφυγή της άμυνας του ξενιστή, ο πολλαπλασιασμός και η βλάβη του ξενιστή.

Οι παράγοντες τοξικότητας περιλαμβάνουν τα επιφανειακά μόρια αλληλεπίδρασης με μόρια του ξενιστή, την παρουσία κάψας οι οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του βακτηρίου σε εχθρικό περιβάλλον, τις βακτηριακές τοξίνες (εξωτοξίνες και ενδοτοξίνες), και τα στοιχεία κίνησης.

## 1.5 Κλινικές εκδηλώσεις

Στελέχη *Εντεροβακτηριακών* σχετίζονται με αποστήματα, πνευμονίες, μηνιγγίτιδες, σηψαιμίες, και λοιμώξεις τραυμάτων, ουροποιητικού συστήματος και εντέρου. Αποτελούν το κύριο συστατικό της φυσιολογικής χλωρίδας του εντερικού συστήματος

των ανθρώπων, αλλά είναι σχετικά ασυνήθιστα ως φυσιολογική χλωρίδα σε άλλα σημεία του σώματος. Μερικά είδη *Εντεροβακτηριακών* αποτελούν σοβαρές αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων [όπως: *E. coli*, *Enterobacter* (όλα τα είδη), *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Citrobacter* (όλα τα είδη), *S. marcescens*]. Τα *Εντεροβακτηριακά* μπορεί να αποτελούν το 80% των κλινικά σημαντικών στελεχών όσον αφορά τους Gram-αρνητικούς βακίλους και 50% των κλινικά σημαντικών βακτηρίων στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια (Murray PR, 2003).

### 1.5.1 Εξωεντερικές λοιμώξεις στον άνθρωπο

Πολλά είδη *Εντεροβακτηριακών* (εκτός από τα είδη *Shigella*, που σπάνια προκαλούν λοιμώξεις έξω από το γαστρεντερικό σωλήνα) συχνά προξενούν εξωεντερικές λοιμώξεις. Ωστόσο, ένας μικρός αριθμός ειδών, όπως *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* και *S. marcescens*, ευθύνονται για τις περισσότερες από αυτές. Οι λοιμώξεις του ουροποιητικού σωλήνα, πρωτίστως η κυστίτιδα, είναι οι πιο κοινές (Schaberg DR, 1991), ακολουθούν οι λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος, τραυμάτων, κυκλοφορικού συστήματος και κεντρικού νευρικού συστήματος. Πολλές από αυτές τις λοιμώξεις, ειδικά η σηψαιμία και μηνιγγίτιδα, είναι απειλητικές για τη ζωή και είναι νοσοκομειακές λοιμώξεις. Εξαιτίας της σοβαρότητας των λοιμώξεων αυτών, η ταχεία απομόνωση, η ταυτοποίηση και ο έλεγχος ευαισθησίας των *Εντεροβακτηριακών* είναι ουσιώδεις.

### 1.5.2 Εντερικές λοιμώξεις στον άνθρωπο

Μερικοί οργανισμοί στην οικογένεια των *Εντεροβακτηριακών* είναι σοβαρή αιτία εντερικών λοιμώξεων σε ανθρώπους παγκοσμίως. Παρόλο που και άλλα είδη της οικογένειας έχουν σχετιστεί ή και έχουν ενοχοποιηθεί για διάρροια, μόνο οργανισμοί από τέσσερα γένη, *Escherichia* (DuPont HL, 1971), (Farmer JJ III, 1985), (Karmali MA, 1989), (Wells JG, 1983), *Salmonella* (Crosa JH, 1973), (Farmer JJ, 1984), (Hickman FW, 1978), *Shigella* (Ewing WH, 1986) και *Yersinia* (Kandolo K, 1985), (Riley G, 1989), έχουν με σαφήνεια τεκμηριωθεί ως εντερικά παθογόνα. Άλλα *Εντεροβακτηριακά* όπως *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Morganella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, και *Serratia*, έχουν «μία σχέση με τη διάρροια» και έχουν ενοχοποιηθεί περιστασιακά (Wadstrom T, 1976).

## 1.6 Ιατρικώς σημαντικά γένη *Εντεροβακτηριακών*

### 1.6.1 *Escherichia*

Το είδος *E. coli* ανακαλύφθηκε το 1885 από τον Theodor Escherich ένα Γερμανό παιδίατρο και βακτηριολόγο. Είναι Gram-αρνητικοί βάκιλλοι που βρίσκονται συχνά στο κατώτερο τμήμα του εντέρου των θερμόαιμων οργανισμών. Η *E. coli* είναι ένα μη-σπορογόνο βακτήριο, συχνά κινούμενο μέσω περίτριχων μαστιγίων και μπορεί να αναπτυχθεί αερόβια και αναερόβια. Τα περισσότερα στελέχη ζυμώνουν γρήγορα την λακτόζη, και οι αποικίες στο MacConkey άγαρ είναι λείες, γυαλιστερές, ημιδιαφανείς στην όψη και χρώματος ροζ. Στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες κάποιων στελεχών περιβάλλονται από μία ζώνη αιμόλυσης. Οι *E. coli* χωρίζονται σε ορολογικές ομάδες, οροτύπους και βιοτύπους (Kauffman F, 1966). Δύο είναι οι επιφανειακές ουσίες στην *E. coli* που αποτελούν την βάση για την ορολογική ταξινόμηση: το θερμοανθεκτικό αντιγόνο O των LPS και το θερμοευαίσθητο αντιγόνο H του μαστιγίου. Το αντιγόνο O προσδιορίζει την ορολογική ομάδα ενός στελέχους και το αντιγόνο H προσδιορίζει τον ορότυπο. Ο βιότυπος προσδιορίζεται από το βιοχημικό προφίλ. Αν το βακτήριο φέρει και έλτρο τότε ένα αντιγόνο (K) του ελύτρου χρησιμοποιείται επίσης, για ταξινόμηση.

Η *E. coli* αποτελεί φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα, όμως μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις κάτω από ορισμένες συνθήκες. Η ανάπτυξη και η σοβαρότητα της λοίμωξης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την τοξικότητα του βακτηρίου και από την κατάσταση των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή. Διαφορετικά στελέχη σχετίζονται με διαφορετικά νοσήματα. Αυτή η μεταβλητότητα έγκειται στο γεγονός ότι διαφορετικά στελέχη έχουν αποκτήσει διαφορετικές ομάδες γονιδίων τοξικότητας.

Η *E. coli* διαθέτει την ικανότητα να μεταφέρει DNA μέσω βακτηριακής σύζευξης, μεταγωγής ή μεταμόρφωσης, που επιτρέπουν το γενετικό υλικό να διαδίδεται οριζοντίως μέσα σε ένα υπάρχων πληθυσμό. Καινούργια στελέχη *E. coli* εξελίσσονται μέσω φυσικών βιολογικών διεργασιών της μετάλλαξης, διπλασιασμού γονιδίων και οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Η *E. coli* είναι ένα από τα πιο ποικίλα βακτηριακά είδη. Μόνο το 20% του γονιδιώματος είναι κοινό σε όλα τα στελέχη (Lukjancenko O, 2010).

### 1.6.1.1 Παθοφυσιολογία

#### *Λοιμώξεις ουροποιητικού*

Η *E. coli* είναι η κυρίως αιτία των λοιμώξεων ουροποιητικού σωλήνα στους ανθρώπους (Stam WE, 1983). Οι λοιμώξεις αυτές συνήθως ξεκινούν με τον αποικισμό της ουρήθρας από στελέχη *E. coli* του παχέος εντέρου ή του κόλπου. Μερικοί παράγοντες τοξικότητας έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στην παθογένεια λοιμώξεων ουροποιητικού σωλήνα. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς τους παράγοντες είναι οι ορότυποι O-K, αιμολυσίνες και η παρουσία προσκολλητινών για τα ουροεπιθηλιακά κύτταρα (Mabeck CE, 1971), (Johnson J, 1991).

Μερικά ουροπαθογόνα στελέχη *E. coli* παράγουν εξωκυττάριας τοξίνες, αιμολυσίνες (Bentin L, 1991) που δρουν ως τοξίνες οι οποίες προκαλούν βλάβη στη μεμβράνη με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου και απελευθέρωση κυτταροπλασματικών συστατικών.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας τοξικότητας είναι η ικανότητα της *E. coli* να αποκτά σίδηρο για την ανάπτυξή της και ουροπαθογόνα στελέχη έχουν πολλαπλά συστήματα δέσμευσης σιδήρου. Επίσης, πολλά ουροπαθογόνα στελέχη έχουν καψίδιο (Orskov I, 1982).

#### *Νεογνική μηνιγγίτιδα*

Μερικά στελέχη *E. coli* με αντιγόνο ελύτρου (K1) σχετίζονται μοναδικά με την νεογνική μηνιγγίτιδα (Robbins JB, 1974). Η σοβαρότητα της νόσου σχετίζεται άμεσα με την παρουσία, την ποσότητα και την ανθεκτικότητα του αντιγόνου K1 (McCracken GH, 1974). Η παρουσία του αντιγόνου K1 παρεμβάλλεται στη φαγοκύτωση και σε συνδυασμό με ορισμένα αντιγόνα O παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στην βακτηριοκτόνο δράση του συμπληρώματος του ορού.

Παρόλο που ο αποικισμός των νεογνών με *E. coli* είναι συχνός, η νόσος είναι σχετικά σπάνια.

#### *Λοιμώξεις εντερικού συστήματος*

Ορισμένα στελέχη *E. coli* σχετίζονται με λοιμώξεις του εντερικού συστήματος σε παιδιά και μεγάλους. Τα περισσότερα από αυτά είναι η αιτία της «διάρροιας των ταξιδιωτών». Ένα χαρακτηριστικό στοιχείο των *E. coli* που προκαλούν διάρροια είναι η ικανότητά τους να αποικίζουν την επιφάνεια του εντερικού σωλήνα του ξενιστή

παρά τους μηχανισμούς άμυνας όπως το γαστρικό υγρό, τις περισταλτικές κινήσεις και τον ανταγωνισμό από την μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Αυτό, εν μέρει, οφείλεται στα επιφανειακά ινίδια για την προσκόλληση στους βλεννογόνους. Οι *E. coli* που προκαλούν διάρροια διαθέτουν ειδικά ινιδιακά αντιγόνα που αυξάνουν την ικανότητα αποικισμού του εντέρου και προσκολλούνται στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου – ένα σημείο που δεν αποικίζεται φυσιολογικά (Natarro JP, 1998), (Okeke IN, 2001). Οι παράγοντες τοξικότητας είναι ξεχωριστοί για κάθε μία από τις ομάδες των *E. coli* που προκαλούν διάρροια. Η ευελιξία του γονιδιώματος της *E. coli* στηρίζεται κυρίως σε δύο γενετικές διαμορφώσεις: τα πλασμίδια που φέρουν στοιχεία τοξικότητας και τις χρωμοσωμικές νησίδες παθογονικότητας.

Υπάρχουν έξι κύριες κατηγορίες *E. coli* που προκαλούν διάρροια (Levine MM, 1987). Παρόλο που οι κατηγορίες αυτές είναι αρκετά διακριτές, έχουν κάποιες υποκείμενες ομοιότητες όσον αφορά την παθογένεια:

- Οι τοξικές ιδιότητες κωδικοποιούνται σε πλασμίδια
- Έχουν μία χαρακτηριστική αλληλεπίδραση με το βλεννογόνο του εντέρου
- Παράγουν εντεροτοξίνες ή κυτοτοξίνες

Οι πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνικές DNA έχουν προσφέρει μία νέα προσέγγιση στον έλεγχο μίας σειράς γονιδίων τοξικότητας της *E. coli*.

Έξι σημαντικές κατηγορίες *E. coli* που προκαλούν διάρροια (Levine MM, 1987) έχουν προσδιοριστεί:

- Εντεροτοξινογόνο *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)
- Εντεροεισβολική *E. coli* (enteroinvasive *E. coli*, EIEC)
- Εντεροαιμορραγική *E. coli* (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)
- Εντεροπαθογόνο *E. coli* (enteropathogenic *E. coli*, EPEC)
- Εντεροσυσσωματωματική *E. coli* (enteroaggregative *E. coli*, EaggEC)
- Διάχυτα προσκολλημένη *E. coli* (diffusely adherent *E. coli*, DAEC)

## Νοσοκομειακές Λοιμώξεις

Η *E. coli* παραμένει μία σημαντική αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Η αυξανόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά ανάμεσα στις *E. coli* αποτελεί μία σημαντική αιτία ανησυχίας στα νοσοκομεία.

### **Βακτηριαμία**

Η *E. coli* είναι η πιο κοινή αιτία νοσοκομειακών βακτηριαμιών. Η πιο κοινή πύλη εισόδου της λοίμωξης για βακτηριαμίες προκαλούμενες από στελέχη *E. coli* και εξω-και ενδο-νοσοκομειακά είναι ο ουροποιητικός σωλήνας (Gransden WR, 1990).

Οι νοσοκομειακές βακτηριαμίες οφείλονται κυρίως σε πνευμονικές λοιμώξεις σε διασωληνωμένους ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία αερισμού ή σε λοιμώξεις ουροποιητικού σωλήνα προκαλούμενες από μόνιμους ουροκαθετήρες. Ασθενείς με κοκκιοκυτταροπενία λόγω λευχαιμίας, καρκίνο ή χημειοθεραπεία είναι σε υψηλό κίνδυνο για βακτηριαμία.

### **Λοιμώξεις ουροποιητικού σωλήνα**

Οι λοιμώξεις ουροποιητικού σωλήνα είναι η πιο συνήθης νοσοκομειακή λοίμωξη και το *E. coli* το κύριο παθογόνο (Hariharan R, 1996). Αναγνωρισμένοι κύριοι παράγοντες κινδύνου για νοσοκομειακές λοιμώξεις ουροποιητικού σωλήνα αποτελούν ο καθετηριασμός και η παρεμπόδιση της ροής ούρων.

### **Άλλες νοσοκομειακές λοιμώξεις**

Οι πνεύμονες είναι ένα κοινό σημείο για νοσοκομειακές λοιμώξεις, παρόλο που είναι δύσκολο να ξεχωρίσουμε μεταξύ των *E. coli* που αποικίζουν τους ανώτερους αεραγωγούς και των *E. coli* που προκαλούν πνευμονικές λοιμώξεις (Cohen J, 2004).

Περίπου το ένα τέταρτο των χειρουργικών λοιμώξεων προκαλούνται από εντεροβακτηροειδή, μεταξύ των οποίων η *E. coli* ευθύνεται για το 8% (Cohen J, 2004).

Νοσοκομειακές λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος συμβαίνουν κυρίως σε νευροχειρουργικούς ασθενείς, νεογνά και ασθενείς που υποβάλλονται σε επεμβάσεις που διαπερνούν το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η μετεγχειρητική μηνιγγίτιδα προκαλείται σε ένα ποσοστό 69% από Gram-αρνητικούς βακίλους, μεταξύ των οποίων σε ποσοστό 70% ευθύνεται η *E. coli* (Cohen J, 2004).

### 1.6.2 *Klebsiella*

Η τρέχουσα ταξινόμηση του γένους *Klebsiella* αναγνωρίζει πέντε είδη (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena*, και *Klebsiella ornithinolytica*) με διάφορα υποείδη.

Όλα τα είδη είναι μη κινητά. Τα στελέχη *Klebsiella* μπορούν να βρεθούν σε κόπρανα υγείων ενηλίκων (Van Kregten E, 1984). Η *Klebsiella pneumoniae* είναι πολύ γνωστή ως η αιτία της πνευμονίας Fiedlander και νοσοκομειακών λοιμώξεων. Τα στελέχη του είδους αυτού συχνά αναπτύσσονται ως βλεννώδεις, λακτόζη-θετικές αποικίες στο MacConkey άγαρ. Στελέχη *Klebsiella* που είναι ινδόλη-θετικά ταξινομούνται ως *Klebsiella oxytoca*. Αυτά τα στελέχη προκαλούν ασθένειες ίδιες με τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae*.

Η *Klebsiella pneumonia* κλινικά είναι το πιο σημαντικό μέλος του γένους *Klebsiella*. Είναι Gram-αρνητικό, προαιρετικά αναερόβιο, μη κινούμενο ραβδοειδές βακτήριο που περιέχει έλκτρο και ζυμώνει τη λακτόζη. Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του στόματος, δέρματος και εντέρου (Ryan KJ, 2004). Ως γενικός κανόνας, οι λοιμώξεις με *Klebsiella* κυρίως παρατηρούνται σε ανθρώπους με εξασθενημένο αμυντικό σύστημα. Πιο συχνά η ασθένεια επηρεάζει άντρες μέσης ηλικίας και ηλικιωμένους με εξουθενωτικές ασθένειες. Αυτός ο πληθυσμός ασθενών πιστεύεται ότι έχει μειωμένη αναπνευστική άμυνα ξενιστή, περιλαμβάνοντας άτομα με διαβήτη, αλκοολισμό, κακοήθειες, ασθένειες του ήπατος, χρόνιες αποφρακτικές πνευμονικές παθήσεις, θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, νεφρική ανεπάρκεια, και μερικές επαγγελματικές εκθέσεις (όπως εργαζόμενοι σε χαρτοποιία). Πολλές από αυτές τις λοιμώξεις αποκτούνται όταν κάποιο άτομο είναι στο νοσοκομείο για κάποιο άλλο λόγο (νοσοκομειακή λοίμωξη).

Η πιο κοινή λοίμωξη που προκαλούν οι *Klebsiellae* έξω από το νοσοκομείο είναι η πνευμονία με τη μορφή βρογχοπνευμονίας, και επίσης η βρογχίτιδα. Αυτοί οι ασθενείς έχουν μία αυξημένη τάση να αναπτύσσουν πνευμονικό απόστημα, σπηλαίωση, εμπύημα, και πλευρικές συμφύσεις. Η θνησιμότητα φτάνει στο 50% ακόμη και με αντιμικροβιακή θεραπεία και μπορεί να είναι και 100% για άτομα με αλκοολισμό και βακτηριαμία.

Εκτός της πνευμονίας, οι *Klebsiellae* μπορούν να προκαλούν και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, των κάτω χοληφόρων οδών, και χειρουργικών τραυμάτων. Το φάσμα των κλινικών ασθενειών περιλαμβάνει πνευμονία,



θρομβοφλεβίτιδα, λοιμώξεις ουροποιητικού συστήματος, χολοκυστίτιδα, διάρροια, λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, λοιμώξεις τραυμάτων, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα, βακτηριαμία και σηψαιμία.. Αν ένα άτομο έχει μία επεμβατική συσκευή στο σώμα του, τότε η λοίμωξη της συσκευής αποτελεί έναν κίνδυνο. Επίσης, η χρήση αντιβιοτικών είναι ένας παράγοντας που αυξάνει τον κίνδυνο για νοσοκομειακές λοιμώξεις με κλεμπσιέλλα. Η σήψη και το σηπτικό σοκ μπορεί να ακολουθούν μία είσοδο βακτηρίων στο αίμα. Οι υγιή άτομα δεν παθαίνουν λοιμώξεις από *Klebsiellae*.

Η λοίμωξη με *Εντεροβακτηριακά* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες αναδύεται ως ένα σημαντικό πρόβλημα της υγειονομικής περίθαλψης (Limbago BM, 2011). Ένα από τα πολλά *Εντεροβακτηριακά* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες είναι η *Klebsiella pneumoniae* η ανθεκτική στις καρβαπενέμες (CRKP). Τα τελευταία 10 χρόνια έχει παρατηρηθεί μία προοδευτική αύξηση των CRKP παγκοσμίως, ωστόσο αυτό το καινούργιο αναδυόμενο νοσοκομειακό παθογόνο είναι πιθανώς πιο γνωστό για μία μεγάλη επιδημία που άρχισε το 2006 στο σύστημα υγείας στο Ισραήλ (Berrie C, 2007). Στην Αμερική περιγράφηκε για πρώτη φορά στη Βόρεια Καρολίνα το 1996 (Yigit H, 2001). Από τότε οι CRKP έχουν εντοπιστεί σε 41 κράτη (Washington Post, 2012) και απομονώνονται τακτικά σε ορισμένα νοσοκομεία στη New York και το New Jersey. Είναι τώρα το πιο κοινό είδος *Εντεροβακτηριακών* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες που απαντάται στην Αμερική. Οι CRKP είναι ανθεκτικές σε σχεδόν όλες τις διαθέσιμες αντιμικροβιακές ουσίες και λοιμώξεις με CRKP έχουν προκαλέσει υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας, ειδικά ανάμεσα σε άτομα με παρατεταμένη νοσηλεία σε νοσοκομείο, τους βαριά πάσχοντες και άτομα εκτεθειμένα σε επεμβατικές συσκευές. Η ανησυχία είναι ότι οι καρβαπενέμες χρησιμοποιούνται συχνά ως φάρμακο τελευταίας επιλογής για τα ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη. Μικρές μεταλλάξεις οδηγούν σε στελέχη πολυανθεκτικά με αποτέλεσμα η αντιμετώπιση των ασθενών με λοιμώξεις από τέτοια στελέχη να είναι από πολύ δύσκολη έως αδύνατη.

Ο πιο σημαντικός μηχανισμός αντοχής των CRKP είναι η παραγωγή της καρβαπενεμάσης *bla<sub>KPC</sub>*. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε ένα κινητό κομμάτι γενετικού υλικού (ένα τρανσποζόνιο, το συγκεκριμένο είναι το Tn4401), που αυξάνει τον κίνδυνο διάδοσης. *Εντεροβακτηριακά* ανθεκτικά σε καρβαπενέμες μπορούν δύσκολα να ανιχνευτούν για το λόγο ότι κάποια στελέχη που έχουν το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>* παρουσιάζουν MIC για τις καρβαπενέμες που είναι ανεβασμένες, αλλά μέσα στο εύρος της ευαισθησίας. Επειδή αυτά τα στελέχη

ταυτοποιούνται ως ευαίσθητα στις καρβαπενέμες, σύμφωνα με τις τυποποιημένες δοκιμές ευαισθησίας, δεν αναγνωρίζονται ως εν δυνάμει παράγοντες κινδύνου, είτε στην κλινική πράξη είτε όσον αφορά τον έλεγχο λοιμώξεων. Ασθενείς με μη αναγνωρισμένο αποικισμό με CRKP αποτελούν τη δεξαμενή για τη μετάδοση στις νοσοκομειακές επιδημίες.

Η έκταση και ο επιπολασμός των CRKP στο περιβάλλον είναι προς το παρόν άγνωστα.

### 1.6.3 *Enterobacter*

Μερικά στελέχη *Enterobacter* είναι παθογόνα και προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις. Τα είδη *Enterobacter* σπάνια προκαλούν ασθένειες σε υγιή άτομα. Παρόλο που έχουν αναφερθεί περιστασιακά λοιμώξεις με *Enterobacter* κοινότητας, οι νοσοκομειακές λοιμώξεις είναι οι πιο συνήθεις. Πιο ευάλωτοι σε τέτοιες λοιμώξεις είναι οι ασθενείς που παραμένουν στο νοσοκομείο, ειδικά στη ΜΕΘ, για παρατεταμένες περιόδους, οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς και αυτοί που βρίσκονται υπό μηχανικό αερισμό. Το ουροποιητικό και αναπνευστικό σύστημα είναι οι πιο συνήθεις θέσεις λοίμωξης. Το ευκαιριακό αυτό παθογόνο διαθέτει μία ενδοτοξίνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της σήψης και τις επιπλοκές της.

Εργαστηριακά χαρακτηριστικά είναι: η θετική αντίδραση λακτόζης, αρνητική δοκιμασία ινδόλης και ουρεάσης (Russo TA, 2008). Το πιο σημαντικό τεστ για την τεκμηρίωση λοιμώξεων με *Enterobacter* είναι η καλλιέργεια. Επίσης, η άμεση Gram χρώση του δείγματος είναι χρήσιμη γιατί επιτρέπει ταχεία διάγνωση μιας λοίμωξης προκαλούμενη από Gram-αρνητικούς βακίλους και βοηθάει στην επιλογή των αντιβιοτικών με γνωστή δράση ενάντια στην πλειοψηφία αυτών των βακτηρίων.

Ένα κλινικά σημαντικό είδος από το γένος *Enterobacter* είναι το *E. cloacae*. Το *E.* είναι ένα συχνό νοσοκομειακό στέλεχος και είναι συχνή αιτία ευκαιριακών λοιμώξεων. Η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι συχνή, και κυρίως στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς, εξαιτίας μίας χρωμοσωμικής επαγωγίμης β-λακταμάσης (Pitout JD, 1997).

Τα είδη *Enterobacter* περιλαμβάνουν έναν υποπληθυσμό οργανισμών που παράγουν μία επαγωγίμη β-λακταμάση σε χαμηλά επίπεδα, η οποία κωδικοποιείται από το

χρωμόσωμα. Με την έκθεση όμως, στις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος, δεύτερης και τρίτης γενιάς, αυτός ο υποπληθυσμός υπερισχύει. Έτσι, μία λοίμωξη με *Enterobacter* που φαίνεται ευαίσθητη στις κεφαλοσπορίνες στην διάγνωση μπορεί να αναπτυχθεί γρήγορα σε ανθεκτική κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι καρβαπενέμες και η κεφεπίμη έχουν ένα πιο σταθερό β-λακταμικό δακτύλιο ενάντια στις λακταμάσες που παράγονται από τα ανθεκτικά στελέχη *Enterobacter*.

Τα είδη *Enterobacter* συναντιούνται παγκόσμια σε μονάδες ΜΕΘ ενηλίκων και νεογνών. Δεδομένα επιτηρήσεων και αναφορές περιστασιακών εξάρσεων από Βόρεια και Νότια Αμερική, Ευρώπη και Ασία δείχνουν ότι αυτά τα βακτήρια αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ευκαιριακό παθογόνο μεταξύ των νεογνών και των εξασθενημένων ασθενών. Η αντοχή των *Enterobacter* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τις αμινογλυκοσίδες, την τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (TMP-SMZ) και τις κοινολόνες φαίνεται να είναι υψηλότερη σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες και το Ισραήλ σε σχέση με Ηνωμένες Πολιτείες και Καναδά. Υψηλότερα επίπεδα της αντοχής των *Enterobacter* στις φλουοροκοινολόνες και τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και τις κεφαλοσπορίνες εξαιτίας παραγωγής ευρέως φάσματος β-λακταμασών έχουν αναφερθεί στη Νότια Αμερική, την Ασία και την περιοχή Ειρηνικού (Rossi F, 2006), (Chow JW, 2005).

## 2.Μικροβιακή Αντοχή

### 2.1 Γενετική βάση της μικροβιακής αντοχής

Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη. Η συγγενής αντοχή είναι ενδογενής και βασίζεται στο μηχανισμό δράσης του φαρμάκου. Η επίκτητη αντοχή προκύπτει από βιοχημικές διαδικασίες που κωδικοποιούνται από βακτηριακά γονίδια.

Η μικροβιακή αντοχή μπορεί να προκύψει από:

### 2.1.1 Γονιδιακές Μεταλλάξεις

Όλα τα αντιβιοτικά έχουν στόχους που συχνά είναι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα βακτηριακά γονίδια και έχουν λειτουργική σημασία για την κυτταρική ανάπτυξη. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντιβιοτικών και πρωτεϊνών στόχων είναι συχνά πολύ ειδικές. Έτσι, η αλλαγή ενός μοναδικού αμινοξέος, ως αποτέλεσμα αλλαγής μιας βάσεως στο γονίδιο, μπορεί μερικές φορές να μεταβάλλει τις αλληλεπιδράσεις αυτές. Μεταλλάξεις που επιφέρουν αντοχή μπορούν να βρεθούν επίσης και σε γονίδια που ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες (Murray PR, 2003).

### 2.1.2 Απόκτηση γονιδίων αντοχής

Οι περισσότεροι αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι φυσικά προϊόντα ή ημισυνθετικά παράγωγα φυσικών προϊόντων. Έτσι, γονίδια αντοχής για τα περισσότερα αντιβιοτικά συχνά υπάρχουν στο μικροβιακό κόσμο, είτε στα είδη που παράγουν αντιβιοτικά, είτε στα είδη που ζουν στο ίδιο οικολογικό περιβάλλον με αυτά. Η πρόκληση για τα ευαίσθητα παθογόνα είναι να βρουν και να αποκτήσουν τα ανθεκτικά στοιχεία. Για τον σκοπό αυτό τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μία σειρά από τεχνικές που προάγουν την γονιδιακή ανταλλαγή. Η πιο απλή από αυτές είναι η φυσική μεταμόρφωση (transformation) που αναφέρεται στην ικανότητα κάποιων βακτηριακών ειδών να προσλαμβάνουν τμήματα DNA από το περιβάλλον κάτω από κατάλληλες συνθήκες (Hakenbeck R, 1998). Τα τμήματα αυτά DNA ενσωματώνονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Σε μερικές περιπτώσεις από αυτόν τον ανασυνδυασμό προκύπτουν λειτουργικά γονίδια.

Ένας άλλος μηχανισμός, που έχουν αναπτύξει τα βακτήρια για την απόκτηση ξένων γονιδίων αντοχής, είναι η βακτηριακή σύζευξη, με μεταφορά συζευκτικών πλασμιδίων (Dunny GM, 1995). Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικό αντιγραφόμενο DNA και μπορούν να κωδικοποιούν μία μεγάλη ποικιλία σημαντικών γονιδίων. Κάποια πλασμίδια έχουν ένα στενό φάσμα ξενιστών ενώ άλλα μεταφέρονται και αντιγράφονται σε διάφορα είδη. Η συχνότητα μεταφοράς μπορεί να είναι πολύ μεγάλη, όπως στην περίπτωση του παράγοντα F του *E. coli* ή πλασμιδίων υπεύθυνων για φερομόνες. Τα πλασμίδια μπορούν να ενσωματώνονται και στο χρωμόσωμα αυξάνοντας έτσι την σταθερότητα της γενετικής πληροφορίας που μεταφέρουν (Rice LB, 1998).

Τα βακτήρια επωφελούνται επίσης, από τους βακτηριοφάγους για γενετική ανταλλαγή. Οι βακτηριοφάγοι παρέχουν στα μη μολυσμένα κύτταρα μία ποσότητα DNA που πλησιάζει το μέγεθος του γενώματός τους (~40kb). Κατά τη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων των φάγων, μερικές φορές, μαζί με το ιϊκό DNA παγιδεύονται και κομμάτια χρωμοσωμικού DNA που γειτονεύουν με τη θέση ενσωμάτωσης του ιού στο χρωμόσωμα ή άλλες φορές περιλαμβάνεται ένα πλασμίδιο κατάλληλου μεγέθους ή ένα τμήμα χρωμοσωμικού DNA μη σχετικό με το ενσωματωμένο γένωμα του φάγου. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται μεταγωγή (transduction).

Επίσης, τα μεταθετά στοιχεία έχουν ενοχοποιηθεί για την μεταφορά γονιδίων αντοχής (Rice LB, 2000). Τα μεταθετά στοιχεία κωδικοποιούν την ικανότητά τους για μεταφορά. Σε μερικές περιπτώσεις, τα μεταθετά στοιχεία κωδικοποιούν και συζευκτικές λειτουργίες που τους επιτρέπουν να μεταφέρονται από βακτηριακό χρωμόσωμα σε βακτηριακό χρωμόσωμα. Τα μεταθετά στοιχεία που στερούνται συζευκτικών λειτουργιών μπορούν επίσης, να μεταφέρονται μεταξύ στελεχών. Ο πιο κοινός μηχανισμός με τον οποίο το επιτυγχάνουν αυτό είναι η παροδική ή και πιο μόνιμη ενσωμάτωσή τους σε μεταφερόμενα πλασμίδια.

### 2.1.3. Μετάλλαξη επίκτητων γονιδίων

Τα βακτήρια απαντάνε στην πρόκληση των αντιμικροβιακών παραγόντων αναπτύσσοντας διάφορους μηχανισμούς αντοχής. Αυτό έχει σαν επακόλουθο την ανάπτυξη καινούργιων αντιμικροβιακών παραγόντων που είναι δραστικοί ενάντια στα ανθεκτικά στελέχη. Η αντοχή στα αντιβιοτικά που οφείλεται στις β-λακταμάσες αποτελεί ένα διδακτικό παράδειγμα στην αλληλεπίδραση αυτή. Η αμπικιλίνη αναπτύχθηκε ως η πρώτη πενικιλίνη με σημαντική κλινική δράση ενάντια στους Gram-αρνητικούς βακίλους. Μέσα σε λίγα χρόνια από την κλινική χρήση της αμπικιλίνης αναφέρθηκαν στελέχη *E. coli* ανθεκτικά σ' αυτό το αντιβιοτικό ως αποτέλεσμα παραγωγής μιας πλασμιδιακής β-λακταμάσης, ονομαζόμενης TEM. Ο *S. aureus* έκφραζε επίσης, μία παρόμοια β-λακταμάση ωθώντας έτσι τη φαρμακευτική βιομηχανία στην ανάπτυξη β-λακταμικών αντιβιοτικών ανθεκτικών στην υδρόλυση. Από τις πιο πετυχημένες ενώσεις ήταν η μεθικιλίνη, οι κεφαλοσπορίνες και οι καρβαπενέμες, με ευρεία δράση ενάντια πολλών ειδών που παράγουν β-λακταμάσες, όπως και οι αναστολείς των β-λακταμασών που αποκαθιστούν τη δράση β-λακταμικών ευαίσθητων στην υδρόλυση. Τέτοιοι αναστολείς είναι το κλαβουλανικό οξύ, η σουλβακτάμη και η ταζοβακτάμη. Οι κεφαλοσπορίνες αποτελούν την πιο πετυχημένη

και ευρεία αναπτυγμένη κατηγορία. Δυστυχώς όμως, η αυξημένη κλινική τους χρήση σχετίζεται με την εμφάνιση ανθεκτικών Gram αρνητικών βακίλων, ειδικά *K. pneumoniae* (Jacoby GA, 1991). Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι στα ανθεκτικά αυτά στελέχη η αντοχή οφείλεται σε β-λακταμάσες οι περισσότερες από τις οποίες είναι παράγωγα της αρχικής TEM λακταμάσης που έχουν προκύψει από σημειακές μεταλλάξεις.

## 2.2 Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής

Οι τρεις κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής είναι οι ακόλουθοι:

### 2.2.1 Τροποποίηση του αντιβιοτικού

Τα ένζυμα αυτά γενικά προσδίδουν υψηλά επίπεδα αντοχής στα αντιβιοτικά ενάντια στα οποία έχουν δραστηριότητα. Έχει περιγραφεί η παραγωγή πολλών βακτηριακών ενζύμων που μεταβάλλουν την δομή του αντιβιοτικού. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι μη υδρολυτικά (ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες) ή υδρολυτικά όπως στην περίπτωση των β-λακταμασών που υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Παρόλο που αυτά τα ένζυμα σε πολλές περιπτώσεις είναι επίκτητα, κάποια είναι ενδογενή σε συγκεκριμένα είδη. Για παράδειγμα, χρωμοσωμικές β-λακταμάσες είναι ενδογενείς σε σχεδόν όλους τους Gram-αρνητικούς βακίλους. Η έκφραση των ενζύμων αυτών συχνά συμβαίνει σε χαμηλά επίπεδα, προσδίδοντας αντοχή μόνο στις πολύ ευαίσθητες β-λακτάμες [όπως συμβαίνει με την *K. pneumoniae* η οποία παρουσιάζει αντοχή στην αμπικιλίνη λόγω έκφρασης της SHV-1 β-λακταμάσης (Rice LB, 2000)], ή σε μη β-λακτάμες (όπως συμβαίνει με την *E. coli* κάτω από κανονικές συνθήκες). Σε κάποια γένη (όπως *Enterobacter*, *Pseudomonas*) χρωμοσωμικά ένζυμα είναι κάτω από ρυθμιστικό έλεγχο, και η διατάραξη αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών έχει ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα αντοχής σε ευρέως-φάσματος β-λακτάμες (Livermore DM, 1992). Σε κάποιες περιπτώσεις, τα ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες είναι ενδογενή σε βακτηριακά είδη, επίσης, όπως η ακετυλτρανσφεράση της *Providencia stuartii* και *Serratia marcescens* (Rather PN, 1993), (Shaw KJ, 1992).

### 2.2.2 Μετατροπή του στόχου δράσης

Μετατροπή του στόχου δράσης, όπου μία απλή μετάλλαξη στο σημείο που φυσιολογικά προσδένεται το αντιβιοτικό μπορεί να είναι ικανή να προκαλέσει κλινικά σημαντική αντοχή στο φάρμακο.

Εφόσον η αλληλεπίδραση του αντιβιοτικού με το μόριο στόχο είναι πολύ ειδική, μικρές τροποποιήσεις του μορίου-στόχου μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στη δέσμευση του αντιβιοτικού. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα αυτού του μηχανισμού, όπως η τροποποίηση των PBP που επηρεάζει τη συγγένεια των μορίων αυτών για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Hakenbeck R, 1998), (Rice LB, 2001). Η τροποποίηση των PBP φαίνεται να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός αντοχής στις β-λακτάμες στα Gram-θετικά βακτήρια, ενώ η παραγωγή β-λακταμάσης ευνοείται στους Gram-αρνητικούς βακίλλους. Παρόλο που οι λόγοι γι' αυτήν την διαφορά δεν είναι γνωστοί, είναι ενδιαφέρον ότι οι β-λακταμάσες που παράγονται από Gram-θετικά βακτήρια διαχέονται στο εξωτερικό μέσο μετά την σύνθεσή τους, ενώ αυτές που παράγονται από Gram-αρνητικούς βακίλλους κατακρατούνται στον περιπλασμικό χώρο από την εξωτερική μεμβράνη. Η ικανότητα να συγκεντρώνουν β-λακταμάσες ενισχύει την αποτελεσματικότητά τους και μπορεί να εξηγεί την προτίμηση γι' αυτόν τον μηχανισμό ανάμεσα στους Gram-αρνητικούς βακίλλους.

Άλλα παραδείγματα του μηχανισμού που έχει να κάνει με την τροποποίηση του μορίου στόχο περιλαμβάνουν τα τροποποιημένα πρόδρομα μόρια του κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα την αντοχή στα γλυκοπεπτίδια, την μεταλλαγμένη DNA γυράση και τοποϊσομεράση IV που προσδίδει αντοχή στις φθοριοκινολόνες, ριβοσωμικοί μηχανισμοί προστασίας που προσδίδουν αντοχή στις τετρακυκλίνες, και μεταλλάξεις της RNA πολυμεράσης που προσδίδουν αντοχή στη ριφαμπικίνη. Ο βαθμός αντοχής που οφείλεται στην τροποποίηση του στόχου είναι μεταβλητός και μπορεί να εξαρτάται από την ικανότητα του μεταλλαγμένου στόχου να εκτελεί την φυσιολογική του λειτουργία.

### 2.2.3 Περιορισμένη πρόσβαση στο στόχο

Είναι αναμφισβήτητο ότι ένα αντιβιοτικό πρέπει να φτάσει τον στόχο του ώστε να είναι αποτελεσματικό. Συνεπώς, όταν υπάρχουν φραγμοί που πρέπει να διαπερνώνται από το αντιβιοτικό, η ενίσχυσή τους μπορεί να είναι ένας ιδιαίτερα αποτελεσματικός μηχανισμός αντοχής. Έτσι, η μειωμένη βακτηριακή διαπερατότητα που οφείλεται σε

αλλαγές της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών μικροβίων, όπως μειώσεις στις ποσότητες των πορινών, έχει καταγραφεί ως ένας σημαντικός παράγοντας αντοχής στην ιμιπενέμη για την *P. aeruginosa*, στην κεφεπίμη για το *E. cloacae* και στην κεφοξιτίνη ή την κεφταζιδίμη για την *K. pneumonia* (Lee EH, 1991), (Arthur M, 1993), (Martínez-Martínez L, 1996). Συνήθως αυτή η περιορισμένη είσοδος του αντιβιοτικού πρέπει να συνδυάζεται με την παραγωγή μίας μέτριας τουλάχιστον ενεργότητας β-λακταμάσης ώστε να προσδίδει υψηλά επίπεδα αντοχής. Φραγμοί στην είσοδο του αντιβιοτικού μπορεί να υπάρχουν και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η μετακίνηση των αμινογλυκοσιδών μέσω κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι μία διαδικασία εξαρτώμενη από οξυγόνο, οπότε αυτά τα αντιβιοτικά είναι ανενεργά σε αναερόβιο περιβάλλον, ως εκ τούτου και ενάντια στα αναερόβια είδη (Leclercq R, 1992).

#### 2.2.4 Αντλίες εκροής

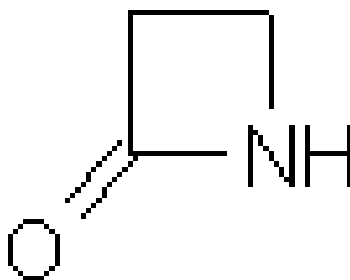
Ανάμεσα στους πιο ενεργούς τομείς έρευνας στην μικροβιακή αντοχή είναι η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των αντλιών που απομακρύνουν μία ή περισσότερες κατηγορίες αντιβιοτικών από το βακτηριακό κύτταρο. Αρκετές κατηγορίες αντλιών έχουν περιγραφεί σε Gram-θετικά και/ή Gram-αρνητικά βακτήρια. Αυτές οι αντλίες μπορεί να είναι επιλεκτικές ή να έχουν μία ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος. Η πλειοψηφία των αντλιών αυτών βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και χρησιμοποιούν κινητήρια δύναμη πρωτονίων για την αποβολή του φαρμάκου. Η ανάλυση του γονιδιώματος βακτηρίων έχει δείξει ότι ο αριθμός των αντλιών που κωδικοποιούνται από πολλά βακτηριακά γονιδιώματα είναι αρκετά μεγαλύτερος απ' ό,τι προηγουμένως πιστευόταν, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συνεισφορά τους στην αντοχή είναι σημαντική και δεν έχει ακόμα εκτιμηθεί πλήρως (Nikaido H, 1998), (Paulsen IT, 1996).

Η απόδοση της αντοχής σε έναν συγκεκριμένο μηχανισμό μπορεί να είναι δύσκολη όταν εμπλέκονται περισσότεροι από έναν μηχανισμοί. Για παράδειγμα, η αντοχή στην ιμιπενέμη, στη *P. aeruginosa*, οφείλεται στην μειωμένη πρόσβαση (μέσω μειωμένης έκφρασης της OmpD) και την παραγωγή της AmpC β-λακταμάσης (Livermore DM, 1992), (Piddock LJ, 1999). Κανένας μηχανισμός από μόνος του δεν είναι αρκετός για να αποδώσει κλινικά σημαντικά επίπεδα αντοχής, απαιτούνται και οι δύο μηχανισμοί ώστε να προκύψουν υψηλά επίπεδα αντοχής.



### 3.β-λακταμικά αντιβιοτικά

Οι β-λακτάμες είναι μία κατηγορία βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών που διαθέτουν έναν τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο που περιέχει άζωτο (**Εικόνα 2**) και αναστέλλουν την σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα τη λύση των μικροοργανισμών μόνο κατά τον πολλαπλασιασμό τους,



**Εικόνα 2.** β-λακταμικός δακτύλιος.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων αποτελούνται από μία σύνθετη πολυμερή ουσία, την πεπτιδογλυκάνη, η οποία περιέχει αμινοξέα και αμινοσάκχαρα που συνδέονται εναλλακτικά με γλυκοσιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας ένα γραμμικό πολυμερές. Τα γραμμικά αυτά μόρια ενώνονται μεταξύ τους με πλευρικές αλυσίδες 4-5 αμινοξέων. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δεσμεύονται και αναστέλλουν ένζυμα που χρειάζονται για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, κυρίως την τρανσπεπτιδάση, αναστέλλοντας έτσι τις σταυροσυνδέσεις των πλάγιων πεπτιδικών αλυσών του κυτταρικού τοιχώματος (**Εικόνα 3**).



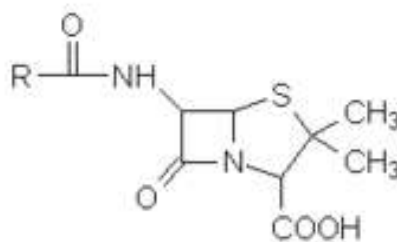
**Εικόνα 3.** Μηχανισμός δράσης β-λακταμικών αντιβιοτικών.

Οι β-λακτάμες είναι κυρίως βακτηριοκτόνες με χρονοεξαρτώμενη δράση. Έχουν μεγάλο θεραπευτικό δείκτη, με κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια τις αλλεργικές αντιδράσεις.

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβάνουν τέσσερις υποκατηγορίες: τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες και τις μονοβακτάμες.

### 3.1 Πενικιλίνες

Η πενικιλίνη μελετήθηκε από τον Alexander Fleming. Αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή θειαζολιδινικό δακτύλιο (**Εικόνα 4**). Η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας του β-λακταμικού δακτυλίου καταλήγει σε φάρμακα με διαφορετικές αντιμικροβιακές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες πενικιλινών (**Πίνακας 1**).

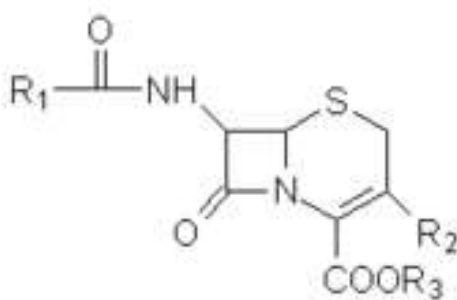


**Εικόνα 4.** Δομή πενικιλινών.

### 3.2 Κεφαλοσπορίνες

Η πρώτη κεφαλοσπορίνη απομονώθηκε από τον μύκητα *Cephalosporium acremonium*, από τον Giuseppe Brotzu το 1945. Αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με ένα εξαμελή διυδροθειαζινικό δακτύλιο (**Εικόνα 5**). Οι διάφορες κεφαλοσπορίνες προκύπτουν από υποκαταστάσεις πλευρικών αλυσίδων στην θέση 7 του β-λακταμικού δακτυλίου και στην θέση 3 του διυδροθειαζινικού δακτυλίου.

Οι κεφαλοσπορίνες διαιρούνται σε πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς με βάση το φάσμα δράσης τους κατά των Gram αρνητικών αερόβιων, το οποίο αυξάνεται από την πρώτη στην τρίτη γενιά (**Πίνακας 2**).



Εικόνα 5. Δομή κεφαλοσπορινών

Πίνακας 1. Κατηγορίες πενικιλινών.

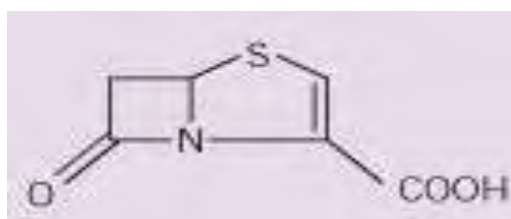
<b>Φυσικές πενικιλίνες</b>	Πενικιλίνη G
	Πενικιλίνη V
	Υδατική προκαϊνούχος πενικιλίνη G
	Βενζαθινική πενικιλίνη G
<b>Αντισταφυλοκοκκικές Πενικιλίνες</b>	Μεθικιλίνη
	Ναφκιλίνη
	Ισοξαζολικές πενικιλίνες
	Οξακιλίνη
	Κλοξακιλίνη
	Δικλοξακιλίνη
	Φλουκλοξακιλίνη
<b>Αμινοπενικιλίνες</b>	Αμπικιλίνη
	Αμοξικιλίνη
<b>Αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες</b>	Καρβοξυπενικιλίνες
	Καρβενικιλίνη
	Τικαρκιλίνη
	Ουρεϊδοπενικιλίνες
	Πιπερακιλίνη
	Αζλοκιλίνη
	Μεζλοκιλίνη

**Πίνακας 2.** Κατηγορίες κεφαλοσπορινών.

<b>Πρώτης γενιάς:</b>	Κεφαδροξίλη, κεφαζολίνη, κεφαλεξίνη, κεφαλοθίνη, κεφαπυρίνη, κεφραδίνη
<b>Δεύτερης γενιάς με δράση κατά του <i>H. influenzae</i>:</b>	Κεφακλόρη, κεφμανδόλη, κεφονισίδη, κεφορανίδη, κεφπροξίλη, κεφουροξίμη, κεφουροξίμη αζετίλ
<b>Δεύτερης γενιάς με δράση κατά του <i>Bacteroides fragilis</i>:</b>	Κεφμεταζόλη, κεφοτετάνη, κεφοξιτίνη
<b>Τρίτης γενιάς</b>	Κεφοταξίμη, κεφτριαζόνη, κεφτριζοξίμη, κεφοπεραζόνη, μοξαλακτάμη
<b>Τρίτης γενιάς με δράση κατά της <i>Pseudomonas aeruginosa</i>:</b>	Κεφταζιδίμη, κεφεπίμη

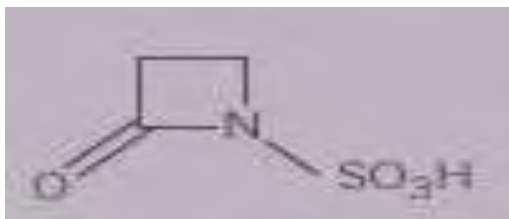
### 3.3 Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή πεναμικό δακτύλιο (**Εικόνα 6**). Έχουν το ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα από όλα τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα αντιβιοτικά. Οι καρβαπενέμες που κυρίως κυκλοφορούν σήμερα είναι η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη. Είναι ανθεκτικές στην υδρόλυση από τις περισσότερες β-λακταμάσες και χρησιμοποιούνται για την θεραπεία λοιμώξεων από βακτήρια ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά.

**Εικόνα 6.** Δομή καρβαπενεμών

### 3.4 Μονοβακτάμες

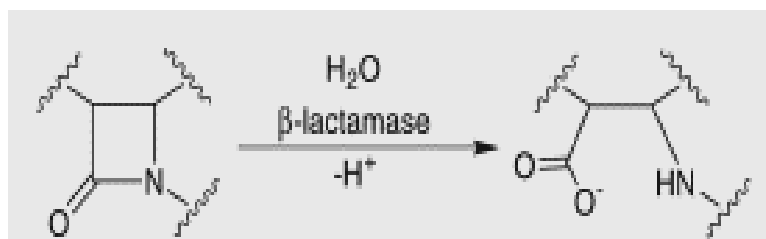
Οι μονοβακτάμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο ενωμένο με μία σουλφονική ομάδα (**Εικόνα 7**). Η μόνη διαθέσιμη μονοβακτάμη είναι η αζτρεονάμη η οποία είναι δραστική μόνο κατά των Gram-αρνητικών αερόβιων βακτηρίων περιλαμβανομένης και της *P.aeruginosa*.



**Εικόνα 7.** Δομή μονοβακτάμης.

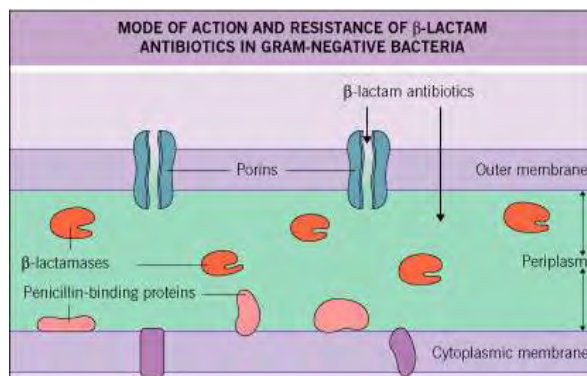
### 4.β-λακταμάσες και η ταξινόμησή τους

Οι β-λακταμάσες είναι μία ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών, με δομικές ομοιότητες, οι οποίες αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά υδρολύοντας τον καρβαμυδικό δεσμό  $O=CN$  του β-λακταμικού δακτυλίου (**Εικόνα 8**). Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα.



**Εικόνα 8.** Υδρόλυση β-λακτάμης από β-λακταμάση

Οι β-λακταμάσες μπορεί να κωδικοποιούνται από χρωμόσωμα ή από πλασμίδια, να είναι ενδογενείς ή επίκτητες, να παράγονται συνεχώς (ιδιοσυστασιακές) ή με επαγωγή (επαγωγίμες), σερίνο-τρανσφεράσες (εστέρας σερίνης) ή μεταλλο-β-λακταμάσες (ión  $Zn^{2+}$ ). Εκκρίνονται στον περιπλασμικό χώρο στα Gram αρνητικά βακτήρια (**Εικόνα 9**) ή στο γύρω περιβάλλον από τα Gram θετικά βακτήρια.



**Εικόνα 9.** Τρόπος δράσης των β-λακταμασών στα Gram αρνητικά βακτήρια.

Για την ταξινόμηση των β-λακταμασών χρησιμοποιούνται δύο σχήματα: το λειτουργικό σύστημα ταξινόμησης των Bush-Jacoby-Medeiros και η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler.

## 4.1 Λειτουργική ταξινόμηση β-λακταμασών

Το σύστημα των Bush-Jacoby-Medeiros ταξινομεί τις β-λακταμάσες σύμφωνα με τις λειτουργικές ιδιότητές τους (προφίλ υποστρώματος και αναστολέων) (Bush K, 1995), (Bush K, 2010):

### 4.1.1 Ομάδα 1. Κεφαλοσπορινάσες

Τα ένζυμα ομάδας I είναι κεφαλοσπορινάσες που ανήκουν στην μοριακή τάξη C και κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα πολλών Εντεροβακτηριακών και λίγων άλλων οργανισμών (Jacoby, 2009). Είναι πιο δραστικές στις κεφαλοσπορίνες απ' ότι στη βενζυλπενικιλίνη και συνήθως είναι ανθεκτικές στην αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ και δραστικές στις κεφαμυκίνες, όπως η κεφοξιτίνη. Τα ένζυμα αυτά έχουν μεγάλη συγγένεια για την αζτρεονάμη ( $K_i = 1-2\text{nM}$ ), αντίθετα με τις κεφαλοσπορινάσες τάξης A (Bush K, 1988), (Bush K, 1982). Σε πολλούς οργανισμούς, όπως το *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* και *Pseudomonas aeruginosa* η έκφραση της AmpC είναι χαμηλή αλλά επάγεται από την έκθεση σε ορισμένα β-λακταμικά, όπως την αμοξυκιλλίνη, την αμπικιλίνη, την ιμιπενέμη και το κλαβουλανικό οξύ (Bush K, 1985), (Jacoby, 2009), (Livermore DM, 1987), (Weber DA, 1990).

#### 4.1.2 Ομάδα 2. β-λακταμάσες σερίνης

Η λειτουργική ομάδα 2 των β-λακταμασών, που περιλαμβάνει τις μοριακές τάξεις A και D, αντιπροσωπεύει τη μεγαλύτερη ομάδα β-λακταμασών. Οι πενικιλινάσες της **υποομάδας 2a** αντιπροσωπεύουν μία μικρή ομάδα β-λακταμασών με ένα σχετικά περιορισμένο υδρολυτικό φάσμα και είναι οι επικρατέστερες β-λακταμάσες στους Gram-θετικούς κόκκους. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν κυρίως τη βενζυλπενικιλίνη και πολλά παράγωγα πενικιλίνης, αλλά ελάχιστα τις κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες ή τις μονοβακτάμες, συνήθως σ' έναν βαθμό  $\leq 10\%$  της υδρόλυσης της βενζυλπενικιλίνης ή αμπικιλίνης. Μία εξαίρεση αποτελεί η εύκολη υδρόλυση της νιτροσεφίνης. Οι β-λακταμάσες της υποομάδας 2 αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζοβακτάμη. Η πλειοψηφία των ενζύμων αυτών είναι χρωμοσωμικές, παρόλο που μερικές σταφυλοκοκκικές πενικιλινάσες κωδικοποιούνται από πλασμίδια.

Οι β-λακταμάσες της **υποομάδας 2b** υδρολύουν εύκολα τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς, όπως την κεφαλοριδίνη και τη κεφαλοθίνη, και αναστέλλονται πολύ καλά από το κλαβουλανικό οξύ και τη ταζοβακτάμη. Περιλαμβάνουν τα ένζυμα TEM-1, TEM-2 και SHV-1, οι πιο κοινές πλασμιδιακές β-λακταμάσες που ταυτοποιήθηκαν το 1970 και αρχές του 1980 (Matthew M, 1979), (Roy C, 1983). Από την ταξινόμηση των β-λακταμασών το 1995 (Bush K, 1995) έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 9 TEM και 29 SHV ένζυμα της υποομάδας 2b (<http://www.lahey.org/studies/>).

Η **υποομάδα 2be** περιλαμβάνει τις ESBL. Αυτά τα εκτεταμένου φάσματος ένζυμα διατηρούν τη δραστικότητα των β-λακταμασών της υποομάδας 2b ενάντια στις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες και επιπλέον υδρολύουν μία ή περισσότερες οξυίμινο-β-λακταμάσες, όπως την κεφοταξίμη, την κεφταζιντίμη και την αζτρεονάμη, γενικά σε ένα βαθμό  $>10\%$  από τη βενζυλπενικιλίνη. Η πρώτη και μεγαλύτερη υποκατηγορία της υποομάδας 2be προέκυψε από αντικαταστάσεις αμινοξέων στις TEM-1, TEM-2 και SHV-1 που διέυρνε το φάσμα των υποστρωμάτων τους (Queenan AM, 2004).

Στις TEM και SHVESBLs προστέθηκαν τα CTX-Μτύπου ένζυμα που σχετίζονται με τις χρωμοσωμικές β-λακταμάσες που έχουν προσδιοριστεί στα είδη *Kluyvera* (Bonnet R, 2004). Όπως υποδηλώνει και το όνομα τους, τα περισσότερα (όχι όμως όλα) ένζυμα CTX-M υδρολύουν την κεφοταξίμη πιο εύκολα απ' ό,τι την κεφταξιδίμη.

Πολλά υδρολύουν εξίσου καλά την κεφεπίμη. Σε αντίθεση με τις TEM ή τις SHV ESBLs, οι CTX-M αναστέλλονται από την ταξοβακτάμη τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους καλύτερα συγκριτικά με το κλαβουλανικό οξύ (Bonnet R, 2004), (Walther-Rasmussen J, 2004). Επίσης, υπάρχουν πιο σπάνιες ESBLs που δεν σχετίζονται με τις TEM, SHV και CTX-M και περιλαμβάνουν τις BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, και μέλη των ενδημικών οικογενειών PER και VEB. Οι β-λακταμάσες της υποομάδας 2be παραμένουν ευαίσθητες στην αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ, ένα χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται για την ανίχνευσή τους σε κλινικά εργαστήρια.

Τα ένζυμα της **υποομάδας 2br** είναι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες που έχουν επίκτητη αντοχή στο κλαβουλανικό οξύ και σχετικούς αναστολείς ενώ διατηρούν το φάσμα δράσης της υποομάδας 2b. Σήμερα, 36 από 135 λειτουργικά χαρακτηρισμένα TEM ένζυμα (όπως: η TEM-30, η TEM-31) και 5 από τα 72 SHV λειτουργικά χαρακτηρισμένα ένζυμα (όπως η SHV-10) έχουν την ιδιότητα αυτή. Καμία CTX-M β-λακταμάση δεν παρουσιάζει αυτό το χαρακτηριστικό μέχρι σήμερα (<http://www.lahey.org/studies/>).

Η **υποομάδα 2ber** περιλαμβάνει ένζυμα που συνδυάζουν το εκτεταμένο φάσμα με σχετική αντοχή στην αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ. Έχουν ονομαστεί και CMT (complex mutant TEM) β-λακταμάσες και περιλαμβάνουν την TEM-50 (CMT-1) (Robin F, 2005), (Sirot D, 1997).

Οι πενικιλινάσες **υποομάδας 2c** χαρακτηρίζονται λειτουργικά από την ικανότητα να υδρολύουν την καρβενικιλίνη ή την τικακιλλίνη με ρυθμό > 60% του ρυθμού για τη βενζυλπενικιλίνη, και με την κλοξακιλλίνη ή την οξακιλλίνη να υδρολύονται σε βαθμό κάτω από το μισό εκείνου της βενζυλπενικιλίνης (Bush K, 1995). Οι πενικιλινάσες αυτές γενικά αναστέλλονται εύκολα από το κλαβουλανικό οξύ.

Η **υποομάδα 2ce** περιλαμβάνει την καρβενικιλινάση εκτεταμένου φάσματος RTG-4 (CARB-10), η οποία έχει περιγραφεί πρόσφατα, και έχει επεκταμένη δράση ενάντια στην κεφεπίμη και την κεφπιρόμη (Potron A, 2009).

Η **υποομάδα 2d** περιλαμβάνει β-λακταμάσες που διακρίνονται από την ικανότητά τους να υδρολύουν την κλοξακιλλίνη ή την οξακιλλίνη σ' έναν βαθμό > 50% απ' ότι την βενζυλπενικιλίνη και γι' αυτό είναι γνωστά σαν ένζυμα OXA. Η καρβενικιλίνη μπορεί επίσης να υδρολυθεί εύκολα. Πολλά όμως μέλη της οικογένειας OXA σήμερα προσδιορίζονται πιο πολύ με βάση τα διατηρημένα αμινοξικά μοτίβα τους παρά με βάση τη λειτουργία τους. Πολλές β-λακταμάσες αυτής της υποομάδας αναστέλλονται από το NaCl.



Στην καινούργια **υποομάδα 2d** περιλαμβάνονται ένζυμα που υδρολύουν την κλοξακιλλίνη ή την οξακιλλίνη και έχουν ένα εκτεταμένο φάσμα που περιλαμβάνει τις οξυΐμινο β-λακτάμες αλλά όχι τις καρβαπενέμες. Η πλειοψηφία των ενζύμων 2de προέρχονται από την OXA-10 με αντικατάσταση 1 έως 9 (όπως: OXA-11, OXA-15).

Οι β-λακταμάσες της καινούργιας **υποομάδας 2df** είναι ένζυμα OXA με υδρολυτική δραστηριότητα καρβαπενεμών. Εμφανίζονται πιο συχνά στα *Acinetobacter baumannii* και παράγονται κυρίως από γονίδια που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα (Walther-Rasmussen J, 2006), παρόλο που τα πλασμιδιακά OXA-23 και OXA-48 ένζυμα έχουν εντοπιστεί σε *Εντεροβακτηριακά* (Bush K, 1995), (Poirel L, 2004). Παρόλο που τα ένζυμα υποομάδας 2d έχουν καθοριστεί λειτουργικά ανάλογα με την ικανότητά τους να υδρολύουν την κλοξακιλλίνη ή την οξακιλλίνη, μόνο λίγα ένζυμα της υποομάδας 2df έχουν δοκιμαστεί χρησιμοποιώντας αυτά τα υποστρώματα (Walther-Rasmussen J, 2006). Από τα ένζυμα που έχουν δοκιμαστεί, μόνο η OXA-50 δεν είχε καμία ανιχνεύσιμη υδρόλυση οξακιλλίνης. Οι χαρακτηρισμένες OXA καρβαπενεμάσες έχουν ασθενή υδρολυτική δραστηριότητα για τις καρβαπενέμες, όπως αποδεικνύεται από τις τιμές  $k_{cat} \leq 1 \text{ s}^{-1}$ , με την ιμιπενέμη να υδρολύεται ταχύτερα και πιο αποτελεσματικά από τη μεροπενέμη. Παρόλο που οι οργανισμοί που παράγουν τα ένζυμα αυτά είναι γενικά πολύ ανθεκτικοί στις καρβαπενέμες, μετασχηματισμένα στελέχη *E. coli* ή αποσυζευκτές που παράγουν αυτά τα ένζυμα είναι συνήθως ευαίσθητα στις καρβαπενέμες (Walther-Rasmussen J, 2006). Τα ένζυμα αυτά και οι οργανισμοί που τα παράγουν τυπικά δεν ανταποκρίνονται στην αναστολή με το κλαβουλανικό οξύ.

Τα χαρακτηριστικά των κεφαλοσπορινασών της **υποομάδας 2e** περιλαμβάνουν την ικανότητα υδρόλυσης των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος (extended-spectrum) και την αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ ή την ταζοβακτάμη. Η επαγώγιμη χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση στους *Proteae* συχνά ανήκει στην υποομάδα αυτή. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να συγχέονται με τις AmpC της ομάδας 1 ή με τις ESBL εξαιτίας του εντοπισμού τους σε παρόμοιους οργανισμούς και με συγκρίσιμο προφίλ αντοχής. Τα ένζυμα της υποομάδας 2e μπορούν να διαφοροποιηθούν από τα ένζυμα AmpC από την χαμηλή συγγένειά τους για την αζτρεονάμη (Bush K, 1989). Ο αριθμός των ενζύμων 2e έχει παραμείνει σταθερός από το 1995 και δεν αναμένεται να συμπεριλάβει πολλά καινούργια μέλη στο μέλλον, πιθανώς γιατί πολλά από τα ένζυμα αυτά τώρα αναγνωρίζονται ως ESBLs.

Οι καρβαπενεμάσες σερίνης της μοριακής τάξης A αποτελούν την **υποομάδα 2f**. Οι καρβαπενέμες είναι τα διακριτικά υποστρώματα για τα ένζυμα αυτά, τα οποία αναστέλλονται καλύτερα από τη ταξοβακτάμη παρά από το κλαβουλανικό οξύ. Οι κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (extended-spectrum), όπως η κεφταζιδίμη, δεν υδρολύονται καλά από τα ένζυμα SME και IMI-1, αλλά η αζτρεονάμη μπορεί να διασπαστεί από τα περισσότερα από αυτά, εκτός από τη GES-3 και τη GES-4. Η οικογένεια των SME, IMI-1 και NMC-1 β-λακταμασών, είναι αντιπροσωπευτικές των χρωμοσωμικών ενζύμων της υποομάδας 2f (Queenan AM, 2007). Ωστόσο, πιο ανησυχητικές, είναι οι β-λακταμάσες της υποομάδας 2f που κωδικοποιούνται σε πλασμίδια, όπως τα ένζυμα KPC και μερικά GES (προηγουμένως IBC). Οι KPC καρβαπενεμάσες ειδικότερα, έχουν συσχετιστεί πρόσφατα με μεγάλες επιδημικές εξάρσεις πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών λοιμώξεων σε νοσοκομεία, συμπεριλαμβανομένων αυτών στη μητροπολιτική περιοχή Νέας Υόρκης (Bradford PA, 2004), (Bratu S, 2005), (Woodford N, 2004) και Ισραήλ (Leavit A, 2007), με την εξάπλωσή τους τώρα να είναι παγκόσμια (Naas T, 2005), (Villegas MV, 2007), (Wei ZQ, 2007), (Pournaras S, 2009).

#### 4.1.3 Ομάδα 3.Μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs)

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες, μία μοναδική ομάδα β-λακταμασών και δομικά και λειτουργικά, συνήθως παράγονται σε συνδυασμό με μία δεύτερη ή τρίτη β-λακταμάση στα κλινικά στελέχη. Διαφέρουν δομικά από τις άλλες β-λακταμάσες από την απαίτησή τους για ένα ιόν ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο. Λειτουργικά, κάποτε, διακρίνονταν κυρίως από την ικανότητά τους να υδρολύουν τις καρβαπενέμες, αλλά μερικές β-λακταμάσες έχουν αποκτήσει τώρα την ικανότητα αυτή. Σε αντίθεση με τις β-λακταμάσες σερίνης, οι MBLs έχουν φτωχή συγγένεια ή υδρολυτική ικανότητα για τις μονοβακτάμες και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ ή τη ταξοβακτάμη. Αντιθέτως, αναστέλλονται από χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA, διπικολινικό οξύ, ή 1,10-ο-φαινανθρολίνη (Laraki N, 1999), (Marchiaro P, 2008). Αυτά τα μεταλλο-ένζυμα έχουν χωριστεί με βάση τη δομή τους (υποκατηγορίες B1, B2 και B3) ή με βάση τη λειτουργία τους (υποομάδες 3a, 3b και 3c) (Rasmussen BA, 1997). Οι MBLs αρχικά είχαν αναγνωριστεί ως χρωμοσωμικά ένζυμα σε Gram-θετικούς ή περιστασιακά Gram-αρνητικούς βακίλλους, όπως *Bacteroides fragilis* (Yotsuji A, 1983) ή *Stenotrophomonas maltophilia* (Livermore DM, 2000), (Mercuri PS, 2002),

και ο αριθμός τους παρέμεινε σταθερός για πολλά χρόνια. Όταν οι MBLs άρχισαν να εμφανίζονται κινητά στοιχεία, έγιναν πιο περίπλοκες και αντικείμενο της εξελικτικής πίεσης σε μία ποικιλία ξενιστών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενζυμικών οικογενειών με αρκετές δεκάδες μοναδικές παραλλαγές. Με βάση τον πιο εκτενή βιοχημικό χαρακτηρισμό του αυξανόμενου αριθμού των μεταλλο-β-λακταμασών, σήμερα προτείνεται να περιγράφονται μόνο δύο λειτουργικές υποομάδες. Η υποομάδα 3a περιλαμβάνει τις μεγαλύτερες οικογένειες των πλασμιδιακών MBL, όπως τα ένζυμα IMP και VIM που έχουν εμφανιστεί παγκόσμια, πιο συχνά σε αζυμωτικά βακτήρια αλλά και σε *Εντεροβακτηριακά* (Queenan AM, 2007). Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην μοριακή υποκατηγορία B1 (Frère JM, 2005), (Galleni M, 2001), (Garau G, 2004). Επιπλέον, η L1 MBL από τη *S. maltophilia* όπως και οι MBLs υποκατηγορίας B3 (όπως η CAU-1, GOB-1, και FEZ-1) προστίθενται στην υποομάδα 3a (Bellais S, 2000), (Rasmussen BA, 1997). Τα ένζυμα αυτά διαφέρουν από τα άλλα της υποομάδας 3a στα αμινοξέα που εμπλέκονται στη δέσμευση σιδήρου, ωστόσο, και οι δύο δομικές υποκατηγορίες χρειάζονται δύο ιόντα ψευδαργύρου για τη μέγιστη ενζυματική δραστηριότητα και έχουν παρόμοιο προφίλ υποστρωμάτων ευρέως φάσματος (Galleni M, 2001), (Garau G, 2004). Υψηλά επίπεδα υδρόλυσης με βάση τις τιμές  $k_{cat}$  και  $k_{cat}/k_m$  έχουν παρατηρηθεί για τις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες, αλλά όχι τις μονοβακτάμες. Εξαίρεση αποτελεί η FEZ-1 καρβαπενεμάση με προτιμητέα υδρόλυση των κεφαλοσπορινών σε σύγκριση με τις καρβαπενέμες και τις πενικιλίνες, εξαιτίας κυρίως των υψηλών τιμών  $k_m$  για τα τελευταία υποστρώματα (Mercuri PS, 2001).

Η υποομάδα 3b περιλαμβάνει μία μικρότερη ομάδα MBLs που κατά προτίμηση υδρολύουν καρβαπενέμες σε αντίθεση με τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες (Segatore B, 1993). Τα ένζυμα αυτά είναι πιο αποτελεσματικά στην υδρόλυση των καρβαπενεμών όταν δεσμεύεται μόνο ένα ιόν ψευδαργύρου (Hernandez Valladares M, 1997). Σε αντίθεση με τις άλλες υποομάδες των MBLs, η παρουσία ενός δεύτερου ιόντος ψευδαργύρου είναι ανασταλτική για την ενζυμική δραστηριότητα (Costello AL, 2006).

#### 4.1.4 β-λακταμάσες ομάδας 4

Οι β-λακταμάσες αυτές πιθανώς να συμπεριλαμβάνονταν σε μία από τις υπάρχουσες ενζυμικές ομάδες, αν υπήρχε διαθέσιμη περισσότερη πληροφορία σχετικά με αυτές.

Επειδή αυτά τα ένζυμα μέχρι στιγμής δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως, δεν επιχειρήθηκε περαιτέρω κατηγοριοποίησή τους.

## 4.2 Μοριακή ταξινόμηση β-λακταμασών

Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη ταξινόμηση των β-λακταμασών είναι η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler (Ambler RP, 1980), (Hall BG, 2005) που χωρίζει τις β-λακταμάσες σε 4 τάξεις (A, B, C, D) με βάση την ομολογία των αμινοξικών τους αλληλουχιών. Ο Ambler αρχικά προσδιόρισε 2 τάξεις: την τάξη A, τις β-λακταμάσες με ενεργό κέντρο σερίνης; και τη τάξη B, τις μεταλλο-β-λακταμάσες που χρειάζονται ένα δισθενές μεταλλικό ιόν, συνήθως  $Zn^{2+}$ , για να δρουν. Αργότερα βρέθηκε μία νέα τάξη β-λακταμασών σερίνης που έφεραν μικρή ομοιότητα αλληλουχίας με τα τότε γνωστά ένζυμα τάξης A. Η τάξη αυτή προσδιορίστηκε ως τάξη C (Jaurin B, 1981) και τα μέλη της είναι επίσης γνωστά ως 'Amp-C' β-λακταμάσες. Μία άλλη τάξη β-λακταμασών σερίνης, γνωστές ως OXA β-λακταμάσες, βρέθηκαν να έχουν μικρή ομοιότητα με τα ένζυμα είτε της τάξης A ή της τάξης C και καθορίστηκαν ως τάξη D (Ouellette M, 1987). Οι τρεις τάξεις των β-λακταμασών σερίνης είναι επαρκώς διαφορετικές ώστε προγράμματα ομοπαράθεσης όπως το BLAST (Altschul SF, 1997) δεν βρίσκουν ανιχνεύσιμη ομοιότητα αλληλουχίας (Hall BG, 2003), υπάρχει όμως επαρκή δομική ομοιότητα μεταξύ των τριών τάξεων β-λακταμασών σερίνης που είναι ξεκάθαρο ότι είναι ομόλογες, δηλαδή προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο. Μία παρόμοια κατάσταση υπάρχει για τις μεταλλο-β-λακταμάσες, οι οποίες αποτελούν μία ομάδα ενζύμων με εξελικτική προέλευση που είναι ανεξάρτητες από τον πρόγονο των β-λακταμασών σερίνης. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες υδρολύουν τις β-λακτάμες μέσω μίας ενζυμικής διαδικασίας που είναι σαφώς διαφορετική από αυτή των β-λακταμασών σερίνης. Είναι επομένως κατάλληλο να ομαδοποιούνται οι μεταλλο-β-λακταμάσες ξεχωριστά ως τάξη B. Αν και αυτή η ονοματολογία ξεχωρίζει με ακρίβεια τις μεταλλο-β-λακταμάσες από τις β-λακταμάσες σερίνης, ανακριβώς υπαινίσσεται ότι όλες οι μεταλλο-β-λακταμάσες είναι στενά σχετιζόμενες μεταξύ τους. Αυτός ο υπαινιγμός είναι ακατάλληλος γιατί όχι όλες οι μεταλλο-β-λακταμάσες είναι τόσο στενά σχετιζόμενες όσο η τρέχουσα ομαδοποίηση αντικατοπτρίζει. Μέσα στη τάξη B υπάρχουν ένζυμα που δεν μπορούν να ομοπαρεταθούν με βάση ούτε την αλληλουχία DNA ούτε την πρωτεϊνική αλληλουχία. Οι διαφορές αυτές αντιμετωπίστηκαν με τη

υποδιαίρεση της τάξης B σε τρεις υποομάδες, B1, B2, B3 (GalleniM, 2001). Μέλη των υποομάδων B1 και B2 μοιράζονται αρκετή ομοιότητα αλληλουχίας για να θεωρούνται ομόλογα με βάση την αλληλουχία τους, όμως δεν μοιράζονται αρκετή ομοιότητα με τα μέλη της υποομάδας B3 ώστε να θεωρούνται ομόλογά τους (Hall BG, 2003).

### 4.3 β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (ESBLs)

Η εισαγωγή των κεφαλοσπορινών στην κλινική πράξη στις αρχές του 1980 αποτέλεσε μία σημαντική εξέλιξη στην μάχη ενάντια στη μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά που οφείλεται στις β-λακταμάσες. Αυτές οι κεφαλοσπορίνες αναπτύχθηκαν ως απάντηση στην αυξημένη επικράτηση των β-λακταμασών σε ορισμένους οργανισμούς (όπως οι TEM-1 και SHV-1 β-λακταμάσες στην *E.coli* και τη *K. pneumoniae* που υδρολύουν την αμπικιλίνη) και την εξάπλωσή τους σε καινούργιους ξενιστές (όπως *Haemophilus influenza* και *Neisseria gonorrhoeae*). Οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς όχι μόνο ήταν αποτελεσματικές ενάντια στους περισσότερους οργανισμούς που παράγουν β-λακταμάσες, αλλά είχαν και το πλεονέκτημα των μειωμένων νεφροτοξικών παρενεργειών συγκριτικά με τις αμινογλυκοσίδες και τις πολυμυξίνες (Paterson DL, 2005). Η πρώτη αναφορά πλασμιδιακής β-λακταμάσης ικανής να υδρολύει τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος δημοσιεύτηκε το 1983 (Knothe H, 1983). Το γονίδιο που κωδικοποιούσε αυτή την β-λακταμάση είχε μία μετάλλαξη ενός νουκλεοτιδίου συγκριτικά με το γονίδιο που κωδικοποιεί την SHV-1. Σύντομα, και άλλες β-λακταμάσες ανακαλύφθηκαν οι οποίες ήταν στενά σχετιζόμενες με τη TEM-1 και την TEM-2 που είχαν όμως την ικανότητα να προσδίδουν αντοχή στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (Sirot D, 1987), (Brun-Buisson C, 1987). Ως εκ τούτου αυτές οι καινούργιες β-λακταμάσες ονομάστηκαν β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (ESBLs). Στην πρώτη ουσιαστική αναθεώρηση των ESBLs το 1989, επισημάνθηκε από τους Philippon, Labia, και Jacoby ότι οι ESBLs αντιπροσώπευαν το πρώτο παράδειγμα όπου η αντοχή στα β-λακταμικά λόγω β-λακταμασών προέκυπτε από βασικές αλλαγές στο φάσμα υποστρωμάτων των ενζύμων (Philippon A, 1989).

Το 2001 οι ESBLs αναθεωρήθηκαν με δημοσίευση της Patricia Bradford (Bradford PA, 2001). Ο όγκος της γνώσης σχετικά με τις ESBLs έχει αυξηθεί ραγδαία από τότε.

Ο συνολικός αριθμός των ESBLs που έχουν χαρακτηριστεί έως τώρα ξεπερνάει τις 300. Τα ένζυμα αυτά αναλύονται λεπτομερώς στην ιστοσελίδα με την ονοματολογία των ESBLs που φιλοξενείται από τους George Jacoby και Karen Bush (<http://www.lahey.org/studies/>).

Οι ESBLs περιέχουν έναν αριθμό μεταλλάξεων που τους επιτρέπουν να υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά εκτεταμένου φάσματος. Ενώ οι TEM και SHV ESBLs διατηρούν την ικανότητα να υδρολύουν τις πενικιλίνες, δεν είναι καταλυτικά τόσο αποτελεσματικές όσο τα μητρικά ένζυμα (Bush K, 1989). Επιπλέον, η διεύρυνση του ενεργού κέντρου έναντι στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία των ESBLs στους αναστολείς των β-λακταμασών (Jacoby GA, 1991). Οι ESBLs δεν είναι δραστικές ενάντια στις κεφαμικίνες, και τα περισσότερα στελέχη που τις εκφράζουν είναι ευαίσθητα στην κεφοξιτίνη και την κεφοτετάνη. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι στελέχη που παράγουν ESBLs μπορεί να γίνονται ανθεκτικά στις κεφαμικίνες λόγω έλλειψης μιας πορίνης εξωτερικής μεμβράνης (Martínez-Martínez L, 1996), (Pangon, 1989), (Vatopoulos AC, 1990).

### 4.3.1 Τύποι των ESBL

Οι περισσότερες ESBLs είναι παράγωγα των ενζύμων TEM ή SHV (Jacoby GA, 1991), (Bush K, 1995). Και στις δύο οικογένειες, λίγες σημειακές μεταλλάξεις σε επιλεγμένες θέσεις στο γονίδιο έχουν ως αποτέλεσμα το φαινότυπο εκτεταμένου φάσματος. Οι SHV και TEM ESBLs βρίσκονται κυρίως σε *E. coli* και *K. pneumoniae* ωστόσο, έχουν βρεθεί επίσης σε *Proteus spp.*, *Providencia spp.* και άλλα γένη *Εντεροβακτηριακών*.

#### 4.3.1.1 SHV ESBLs

Οι ESBLs SHV-τύπου είναι από τις πιο συχνές ESBLs που βρίσκονται σε κλινικά στελέχη (Jacoby GA, 1997.). Το όνομα SHV αναφέρεται στη σουλφυδρυλική μεταβλητή (sulfhydryl variable). Ο χαρακτηρισμός αυτός δόθηκε επειδή θεωρήθηκε ότι η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου αυτού από το p-χλωροϋδραργυροβενζοϊκό ήταν εξαρτώμενη από το υπόστρωμα και ήταν μεταβλητή ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα για τη δοκιμασία (Sykes RB, 1982).

Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η δραστηριότητα δεν επιβεβαιώθηκε ποτέ σε μεταγενέστερες μελέτες με καθαρισμένο ένζυμο.

Η SHV-1 β-λακταμάση βρίσκεται κυρίως στην *K. pneumoniae* και είναι υπεύθυνη για το 20 % της πλασμιδιακής αντοχής στην αμπικιλίνη στο είδος αυτό (Ishii Y, 2005). Σε πολλά στελέχη *K. pneumoniae* το γονίδιο *bla<sub>SHV-1</sub>* είναι ενσωματωμένο στο βακτηριακό χρωμόσωμα (Chetoui H, 1999).

Το 1983, ανακαλύφθηκε ένα στέλεχος *Klebsiella ozaenae* από την Γερμανία που έφερε μία β-λακταμάση η οποία υδρόλυε αποτελεσματικά την κεφοταξίμη, και σε μικρότερο βαθμό την κεφταζιδίμη (Knothe H, 1983). Η αλληλούχιση έδειξε ότι η β-λακταμάση αυτή διέφερε από την SHV-1 στην αντικατάσταση μιας γλυκίνης με σερίνη στην θέση 238. Η μετάλλαξη αυτή από μόνη της είναι υπεύθυνη για τις ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος της καινούργιας β-λακταμάσης που ονομάστηκε SHV-2. Τα επόμενα χρόνια της ανακάλυψης αυτού του ενζύμου οργανισμοί που έφεραν SHV-2 βρέθηκαν σε κάθε κατοικημένη ήπειρο (Paterson DL, 2003), υποδηλώνοντας ότι η επιλεκτική πίεση από τις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς την πρώτη δεκαετία της χρήσης τους ήταν υπεύθυνη γι' αυτό.

Υπάρχουν σχετικά λίγα παράγωγα της SHV-1 β-λακταμάσης. Επιπλέον, αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί στο γονίδιο *bla<sub>SHV</sub>* και οδηγούν σε παραλλαγές της SHV συμβαίνουν σε λίγες θέσεις του. Η πλειοψηφία των SHV παραλλαγών που παρουσιάζουν φαινότυπο ESBL χαρακτηρίζονται από την αντικατάσταση Gly238Ser. Ένας αριθμός παραλλαγών, που σχετίζονται με την SHV-5, έχουν επίσης μία λυσίνη αντί για γλουταμινικό στη θέση 240. Το κατάλοιπο σερίνης στη θέση 238 είναι κρίσιμο για την αποτελεσματική υδρόλυση της κεφταζιδίμης και το κατάλοιπο λυσίνης για την υδρόλυση της κεφοταξίμης (Huletsky A, 1993). Η πλειοψηφία των παραγώγων SHV-τύπου διαθέτουν φαινότυπο ESBL. Ωστόσο, η SHV-10, έχει αναφερθεί ότι έχει ένα φαινότυπο αντοχής στους αναστολείς. Το ένζυμο αυτό φαίνεται να έχει προέρθει από την SHV-5 και έχει μία επιπλέον αντικατάσταση αμινοξέος, γλυκίνη για σερίνη στη θέση 130 (Prinarakis EE, 1997). Είναι ενδιαφέρον ότι ο φαινότυπος αντοχής στους αναστολείς που οφείλεται στη μετάλλαξη Ser130Gly φαίνεται να υπερσχύει του ισχυρού ESBL φαινοτύπου που παρατηρείται στα ένζυμα που έχουν τις μεταλλάξεις Gly238Ser και Gly240Lys που παρατηρούνται σε άλλα ένζυμα SHV-5-τύπου.

#### 4.3.1.2 TEM ESBLs

Οι ESBL TEM-τύπου είναι παράγωγα των TEM-1 και TEM-2 β-λακταμασών. Η TEM-1 αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1965 σε ένα στέλεχος *E. coli* από ασθενή στην Αθήνα, Ελλάδα με το όνομα Temoneira (γι' αυτό και ο χαρακτηρισμός TEM) (Datta N, 1965). Η TEM-1 υδρολύει την αμικιλίνη σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι την καρβενικιλίνη, την οξακιλλίνη ή την κεφαλοθίνη, και έχει αμελητέα δραστηριότητα ενάντια στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος. Επίσης, αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ.

Η TEM-1, είναι η β-λακταμάση που συναντάται πιο συχνά στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Έως 90% της αντοχής στην αμικιλίνη στην *E. coli* οφείλεται στην παραγωγή της TEM-1 (Livermore DM, 1995).

Η TEM-2 έχει το ίδιο υδρολυτικό προφίλ, διαφέρει όμως από την TEM-1 σε ένα αμινοξύ που οδηγεί σε μία διαφορά στο ισοηλεκτρικό σημείο, από 5,4 σε 5,6. Η TEM-13 έχει παρόμοιο υδρολυτικό προφίλ με την TEM-1 και την TEM-2 (Jacoby GA, 1991). Οι TEM-1, TEM-2 και TEM-13 δεν είναι ESBLs. Το 1987, στελέχη *K. pneumoniae* που ανιχνεύτηκαν στη Γαλλία ήδη από το 1984, βρέθηκαν να φέρουν μία νέα πλασμιδιακή β-λακταμάση CTX-1 (Brun-Buisson C, 1987), (Sirot D, 1987). Το ένζυμο αρχικά ονομάστηκε CTX-1 λόγω της αυξημένης δραστηριότητας ενάντια στην κεφτοταξίμη. Το ένζυμο αυτό, το οποίο τώρα ονομάζεται TEM-3, διέφερε από την TEM-2 σε δύο αμινοξέα (Sougakoff W, 1988). Η TEM-3 μπορεί να μην ήταν η πρώτη ESBL TEM-τύπου. Μια *K. oxytoca*, που έφερε ένα πλασμίδιο το οποίο περιείχε ένα γονίδιο που κωδικοποιούσε αντοχή στην κεφταζιδίμη, απομονώθηκε πρώτα στο Λίβερπουλ, Αγγλία, το 1982 (Du Bois SK, 1995). Η υπεύθυνη β-λακταμάση ήταν αυτή που σήμερα ονομάζεται TEM-12. Είναι ενδιαφέρον ότι το στέλεχος ήταν από μία μονάδα νεογνών που είχε πληγεί από μία επιδημία από *K. oxytoca* οι οποίες παρήγαγαν TEM-1 β-λακταμάση. Η κεφταζιδίμη χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο για την αντιμετώπιση των μολυσμένων ασθενών, όμως τα στελέχη *K. oxytoca* που απομονώθηκαν στη συνέχεια έφεραν TEM ESBL (Du Bois SK, 1995). Αυτό είναι ένα καλό παράδειγμα της εμφάνισης των ESBLs ως απάντηση στην επιλεκτική πίεση που προκαλούν οι κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος. Πάνω από 100 β-λακταμάσες TEM-τύπου έχουν περιγραφεί, από τις οποίες η πλειοψηφία είναι ESBLs. Οι αντικαταστάσεις αμινοξέων στα ένζυμα TEM συμβαίνουν σε ένα περιορισμένο αριθμό θέσεων. Οι συνδυασμοί των αλλαγών αυτών έχουν ως αποτέλεσμα διάφορες



ανεπαίσθητες μεταβολές στους ESBL φαινοτύπους, όπως η ικανότητα για την υδρόλυση συγκεκριμένων οξυμινών-κεφαλοσπορινών όπως η κεφταζιδίμη και η κεφοταξίμη, ή αλλαγές στα ισοηλεκτρικά τους σημεία που κυμαίνονται από 5.2 έως 6.5. Οι αλλαγές σε αμινοξέα σε σχέση με τη TEM-1 και τη TEM-2 καταγράφονται στο <http://www.lahey.org/studies/>. Η αντικατάσταση αμινοξικών καταλοίπων σε συγκεκριμένα σημεία είναι ιδιαίτερα σημαντική για να προκύψει ο ESBL φαινότυπος. Έτσι, οι αντικαταστάσεις αυτές περιλαμβάνουν αυτή του γλουταμινικού από λυσίνη στην θέση 104, της αργινίνης με σερίνη ή ιστιδίνη στη θέση 164, της γλυκίνης με σερίνη στη θέση 238 και το γλουταμινικό με λυσίνη στη θέση 240 (Bradford PA, 2001). Παρόλο που οι β-λακταμάσες TEM-τύπου απαντώνται περισσότερο σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae*, βρίσκονται επίσης, με μία αυξανόμενη συχνότητα, και σε άλλα είδη gram-αρνητικών βακτηρίων. Οι ESBLs TEM-τύπου έχουν αναφερθεί σε γένη *Εντεροβακτηριακών* όπως *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Salomonella spp* (Bonnet R, 1999), (Marchandin H, 1999), (Morosini MI, 1995), (Paltzkill T, 1995), (Perilli M, 2000), (Tessier F, 1998). Επιπλέον, οι ESBL TEM-τύπου έχουν βρεθεί και σε μη Εντεροβακτηριακά Gram-αρνητικά βακτήρια. Η TEM-42 β-λακταμάση έχει βρεθεί σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* (Mugnier P, 1996).

Ένας αριθμός TEM παραγώγων έχουν βρεθεί να έχουν μειωμένη συγγένεια για τους αναστολείς β-λακταμασών. Με λίγες εξαιρέσεις, τα ένζυμα TEM-τύπου που είναι λιγότερο ευαίσθητα στους αναστολείς των β-λακταμασών (Fiett J, 2000) έχουν αμελητέα υδρολυτική δράση ενάντια στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και δεν θεωρούνται ESBLs.

Ωστόσο, έχουν απομονωθεί TEM β-λακταμάσες που διατηρούν την ικανότητα να υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και επίσης εκδηλώνουν αντοχή στους αναστολείς. Αυτές αναφέρονται ως complex mutants των TEM (CMT-1 έως 4), (Poirel L, 2004), (Sirot D, 1997).

#### 4.3.1.3 CTX-M ESBLs

Στην Ιαπωνία το 1986, ο Matsumoto et al. (Matsumoto Y, 1988) ανακάλυψαν μία μη-TEM, μη-SHV ESBL που ονομάστηκε FEC-1, σε ένα στέλεχος *E. coli* με αντοχή στην κεφοταξίμη, το οποίο απομονώθηκε από χλωρίδα κοπράνων ενός εργαστηριακού

σκύλου που χρησιμοποιούσαν για φαρμακοκινητικές μελέτες β-λακταμικών αντιβιοτικών. Στη Γερμανία, στις αρχές του 1989, ο Bauernfeind *et al.* (Bauernfeind, 1990) ανέφεραν ένα κλινικό στέλεχος *E. coli* με αντοχή στην κεφοταξίμη το οποίο παρήγαγε μία ESBL, μη-TEM και μη-SHV-τύπου, η οποία ορίστηκε ως CTX-M-1 λόγω της υδρολυτικής της ικανότητας ενάντια στην κεφοταξίμη. Παράλληλα, μία εκρηκτική εξάπλωση στελεχών σαλμονέλλας με αντοχή στην κεφοταξίμη ξεκίνησε στην Νότια Αμερική (Bauernfeind A, 1992), (Power P, 1999). Οι β-λακταμάσες υπεύθυνες για την αντοχή στην κεφοταξίμη που παρατηρήθηκαν σε αυτές τις διαφορετικές περιοχές είχαν αλκαλικές τιμές pI, παρείχαν μεγαλύτερη αντοχή στην κεφοταξίμη απ' ό,τι στην κεφταζιδίμη, και παρουσίαζαν μία πολύ μεγάλη υδρολυτική δράση ενάντια στην κεφοταξίμη και ευαισθησία στους αναστολείς. Το 1992, ο ίδιος τύπος ESBL αναφέρθηκε σε κλινικό στέλεχος *E. coli* MEN, που απομονώθηκε στις αρχές του 1989 στη Γαλλία από έναν ασθενή ιταλικής υπηκοότητας (Bernard H, 1992). Τον ίδιο χρόνο ο Barthélémy *et al.* (Barthélémy M, 1992) αλληλούχισαν το ένζυμο αυτό, που ονομάστηκε MEN-1 και παρουσίαζε μόνο 39% ομοιότητα με τα ένζυμα TEM και SHV. Ήταν η πρώτη αλληλουχία μιας μη-TEM, μη-SHV ESBL. Λίγα χρόνια αργότερα, ο Ishii *et al.* (Ishii Y, 1995) αναφέρθηκαν σε ένα MEN-1 σχετικό ένζυμο (83% ομολογία), την Toho-1, που παράχθηκε από ένα στέλεχος *E. coli* ανθεκτικό στην κεφοταξίμη, το οποίο απομονώθηκε το 1993 στην Ιαπωνία. Η αλληλούχιση των δύο μη-TEM, μη-SHV γονιδίων που κωδικοποιούσαν ESBLs, το 1996, έδειξε ότι η CTX-M-1 είναι ίδια με τη MEN-1 και είναι μία παραλλαγή της Toho-1, ορισμένο ως CTX-M-2 σε ένα στέλεχος σαλμονέλλας ανθεκτικό στην κεφοταξίμη που απομονώθηκε στην Αργεντινή το 1990 (Bauernfeind A, 1996). Στην Πολωνία, το 1996, ο Gniadkowski *et al.* (Gniadkowski M, 1998) εντοπίσανε μία παραλλαγή της CTX-M-1, που ορίσανε CTX-M-3, σε διαφορετικά μέλη της οικογένειας των *Εντεροβακτηριακών*. Λίγα χρόνια αργότερα, η αλληλούχιση του γονιδίου που κωδικοποιούσε τη FEC-1 έδειξε ότι διαφέρει από τη CTX-M-3 μόνο σε δύο αντικαταστάσεις στο πεπτιδίο σήματος. Από τότε τα ένζυμα CTX-M έχουν σχηματίσει μία ταχέως αναπτυσσόμενη οικογένεια ESBLs που έχει εξαπλωθεί σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές και ανάμεσα σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών βακτηρίων και ειδικότερα μέλη της οικογένειας των *Εντεροβακτηριακών*.

Η ονομασία 'CTX' δείχνει την ισχυρή υδρολυτική ικανότητα αυτών των β-λακταμασών ενάντια στην κεφοταξίμη. Η ισχυρή δραστηριότητα κεφοταξιμάσης σχετίζεται με την μοναδική γεωμετρία της θέσης δέσμευσης της β-λακταμάσης, η

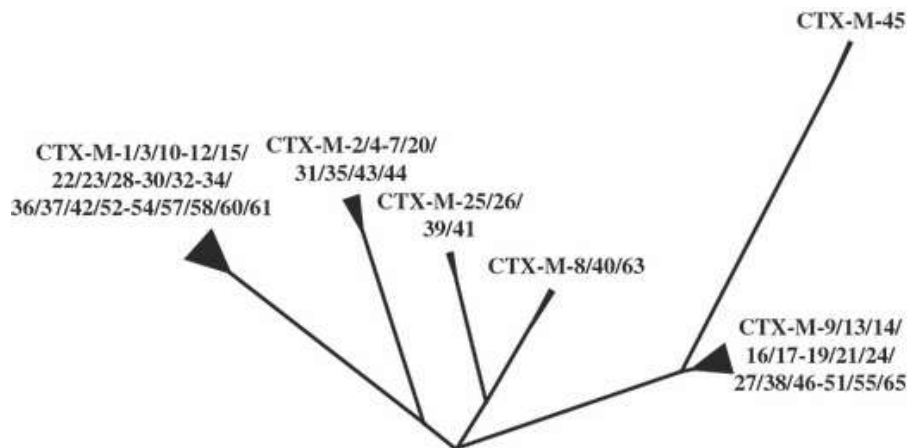
οποία επιτρέπει αποτελεσματική αναγνώριση των πενικιλινών, περιορισμένου φάσματος κεφαλοσπορινών και κεφοταξίμης όχι όμως του ογκώδους μορίου της κεφταζιδίμης (ChenY, 2005), (Ibuka AS, 2003). Οι οργανισμοί που παράγουν β-λακταμάσες CTX-M-τύπου τυπικά φαίνεται να είναι ανθεκτικοί ή να παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην κεφοταξίμη (επίσης στην κεφτριαξόνη και την κεφποδοξίμη), ενώ οι MICs για την κεφταζιδίμη είναι συνήθως σαφώς στο εύρος ευαισθησίας. Ωστόσο, κάποιες ESBLs CTX-M-τύπου μπορεί όντως να υδρολύουν την κεφταζιδίμη και να παρέχουν αντοχή στην κεφαλοσπορίνη αυτή (υψηλές MICs που φτάνουν και 256 µg/ml) (Baraniak A, 2002), (Poirel L, 2002), (Sturenburg E, 2004). Πιθανόν, αυτές έχουν επιλεγεί από την μαζική χρήση της κεφταζιδίμης στην κλινική πρακτική (Bonnet R, 2004), (Cartelle M, 2004), (Bae IK, 2006). Οι μεταλλάξεις στις παραλλαγές αυτές συμβαίνουν σε δύο δομικά στοιχεία που καθορίζουν τη θέση δέσμευσης της β-λακτάμης, πιο συγκεκριμένα στο τερματικό μέρος της B3 β-αλυσίδας και τον Ω-βρόγχο. Η αντικατάσταση Asp240Gly στο τερματικό μέρος της B3 β-αλυσίδας είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ευελιξία της β-αλυσίδας με αποτέλεσμα το ενεργό σημείο να είναι πιο προσβάσιμο από το ογκώδες μόριο της κεφταζιδίμης (Chen Y, 2005) ενώ η αντικατάσταση στον Ω-βρόγχο (στη θέση 167), προφανώς τροποποιεί τον τρόπο αλληλεπίδρασης των β-λακταμών με τη θέση δέσμευσης (Kimura S, 2004). Συνολικά, οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα μία μικρή αύξηση στην καταλυτική αποτελεσματικότητα του ένζυμου ενάντια στην κεφοταξίμη (Bonnet R, 2004), (Cartelle M, 2004), (Bae IK, 2006). Ωστόσο, αυτό δεν είναι αρκετό για να ανεβάσει σημαντικά τις MICs για την κεφταζιδίμη για τα στελέχη που παράγουν μεταλλαγμένα ένζυμα. Οι μεταλλάξεις στον Ω-βρόγχο, σε αντίθεση με την αντικατάσταση Asp240Gly σχετίζονται με σημαντική μείωση στην καταλυτική αποτελεσματικότητα του ενζύμου για άλλα υποστρώματα (Bonnet R, 2004), (Cartelle M, 2004), (Bae IK, 2006).

Οι β-λακταμάσες CTX-M-τύπου υδρολύουν την κεφεπίμη με μεγάλη αποτελεσματικότητα (Tzouvelekis LS, 2000) και οι MICs για την κεφεπίμη είναι υψηλότερες απ' αυτές που παρατηρούνται σε βακτήρια που παράγουν άλλους τύπους ESBL (Yu WL, 2002). Η ταξοβακτάμη εμφανίζει περίπου δεκαπλάσια ανασταλτική δράση απ' ότι το κλαβουλανικό οξύ ενάντια στις β-λακταμάσες CTX-M-τύπου (Bush K, 1993). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ίδιος οργανισμός μπορεί να φέρει συγχρόνως ESBLs CTX-M-τύπου και SHV-τύπου ή ESBLs και β-λακταμάσες AmpC-τύπου, γεγονός που μπορεί να αλλάξει το φαινότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά (Yan JJ, 2000).

Φαίνεται ότι οι β-λακταμάσες CTX-M-τύπου σχετίζονται στενά με τις β-λακταμάσες των *Kluyvera* spp. (Decousser JW, 2001), (Humeniuk C, 2002), (Oliver A, 2001), (Poirel L, 2002). Χρωμοσωμικές β-λακταμάσες από διάφορα είδη *Kluyvera*, ειδικότερα από *Kluyvera ascorbata* και *Kluyvera georgiana*, έχουν ταυτοποιηθεί ως πιθανές πηγές συγκεκριμένων *bla*<sub>CTX-M</sub> γονιδίων των ομάδων CTX-M-1, CTX-M-2 και CTX-M-9. Αυτό οφείλεται στην υψηλή ομολογία των *bla*<sub>CTX-M</sub> γονιδίων με τα χρωμοσωμικά γονίδια β-λακταμασών KLUG-1 από την *K. georgiana* και KLUA-1 από την *K. ascorbata* (Olson AB, 2005), (Rodríguez MM, 2004). Η KLUG-1 μοιράζεται 99% ομοιότητα με τη CTX-M-8 (Poirel L, 2002). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι γειτονικές αλληλουχίες των γονιδίων *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, και *bla*<sub>CTX-M-10</sub> έχουν υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα με αυτές που περιβάλλουν τα γονίδια β-λακταμασών στην *Kluyvera* (Olson AB, 2005), (Power P, 2005), (Oliver A, 2001).

Οι β-λακταμάσες CTX-M-τύπου έχουν 40% ή λιγότερη ομοιότητα με τις TEM και SHV ESBLs. Ο αριθμός των CTX-M ESBLs αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς. Αυτές οι β-λακταμάσες έχουν τώρα ανιχνευτεί σε κάθε κατοικημένη ήπειρο (Alobwede I, 2003), (Baraniak A, 2002), (Baraniak A, 2002), (Bou G, 2002), (Brenwald NP, 2003), (Cao V, 2002), (Chanawong A, 2002), (Coque TM, 2002), (Dutour C, 2002), (Kariuki, 2001), (Ma L, 2002), (Moland ES, 2003), (Pai H, 2001), (Paterson DL, 2003), (Radice M, 2002), (Wang H, 2003), (Yu WL, 2002). Για μερικά χρόνια οι CTX-M ESBLs εντοπίζονταν κυρίως σε τρεις γεωγραφικές περιοχές: Νότια Αμερική, Άπω Ανατολή και Ανατολική Ευρώπη. Στην Δυτική Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική οι CTX-M ESBLs παλιότερα φαινόταν να μην ήταν τόσο συχνές (De Champs C, 2000). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, ένας αριθμός συγγραφέων έχουν αναφέρει την εμφάνιση των ESBLs CTX-M-τύπου στις περιοχές αυτές (Alobwede I, 2003), (Moland ES, 2003), (Bonnet R, 2004), (Mushta, 2003), (Pitout JD, 2004), (Poirel L, 2001). Λαμβάνοντας υπόψη τα εκτεταμένα ευρήματα για τις CTX-MESBLs στην Κίνα και την Ινδία, εικάζεται ότι οι CTX-M β-λακταμάσες είναι τώρα, πραγματικά, ο πιο συχνός ESBL τύπος σε όλο τον κόσμο.

Πάνω από 50 παραλλαγές αλληλόμορφων είναι γνωστά ως τώρα και ομαδοποιούνται σε 6 ομάδες με βάση την αμινοξική αλληλουχία τους (<http://www.lahey.org/studies/>). Κάθε ομάδα ονομάστηκε από το μέλος που περιγράφηκε πρώτο και περιλαμβάνει αλληλόμορφες παραλλαγές που διαφέρουν μεταξύ τους σε ένα ή λίγα κατάλοιπα αμινοξέων [Εικόνα 10 (Rossolini GM, 2008)].



**Εικόνα 10.** Οι έξι γνωστές ομάδες των CTX-M β-λακταμασών σε ένα δένδρογράμμο που απεικονίζει τις ομοιότητες σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Ο βαθμός απόκλισης αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών ομάδων κυμαίνεται από 9.3 % - 32 % (ή 25 % μη λαμβάνοντας υπόψη το πλέον αποκλίνον CTX-M-45 ένζυμο) και μέσα σε κάθε ομάδα είναι  $\leq 3.5$  %. Η CTX-M-14 είναι ίδια με τη CTX-M-8, και μόνο η πρώτη έχει συμπεριληφθεί. Η Toho-1 αντιστοιχεί στη CTX-M-44, η Toho-2 στη CTX-M-45, η UOE-1 στη CTX-M-15 και οι UOE-2 και Toho-3 στη CTX-M-14.

### **Κινητοποίηση των γονιδίων *bla*<sub>CTX-M</sub>**

Διάφορα γενετικά στοιχεία εμπλέκονται στην κινητοποίηση των γονιδίων *bla*<sub>CTX-M</sub>. Οι αλληλουχίες εισαγωγής (ISs) ISEcp1 και ISCR1 (προηγουμένως CR1 ή orf513) φαίνεται να ενεργοποιούν την κινητοποίηση των χρωμοσωμικών γονιδίων β-λακταμάσης των ειδών *Kluyvera*, που έχει μεγάλη ομολογία με τα γονίδια *bla*<sub>CTX-M</sub> (Cantón R, 2006). Αυτές οι ISs επιλεκτικά συνδέονται με ειδικά γονίδια: Η ISEcp1 σχετίζεται με τα περισσότερα γονίδια των ομάδων CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 και CTX-M-25 και η ISCR1 με το *bla*<sub>CTX-M-2</sub> ή το *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (Novais A, 2006), (Oliver A, 2001), (Cantón R, 2006), (García A, 2005), (Toleman MA, 2006). Επίσης, φαίνεται να εμπλέκονται και αλληλουχίες που σχετίζονται με φάγους, οι οποίες έχουν εντοπιστεί μόνο στο περιβάλλον του γονιδίου *bla*<sub>CTX-M-10</sub> στην Ισπανία (Oliver A, 2005).

Τα γονίδια *bla*<sub>CTX-M</sub> που είναι ενσωματωμένα σε ιντεγκρόνια κλάσης 1 τα οποία φέρουν ISCR1 σχετίζονται με διάφορα Tn402-παράγωγα, και συχνά με τρανσποζόνια υδραργύρου όπως Tn21. Τα γονίδια *bla*<sub>CTX-M</sub> που συνδέονται με την ISEcp1 συχνά βρίσκονται σε περιοχές πολυαντοχής που περιέχουν διαφορετικά τρανσποζόνια και ISs. Τα πλασμίδια αυτά συχνά φέρουν γονίδια αντοχής στις αμινογλυκοσίδες, τις τετρακυκλίνες, τις σουλφοναμίδες ή φθοριοκινολόνες, τα οποία θα πρέπει να έχουν διευκολύνει την εξάπλωση των γονιδίων *bla*<sub>CTX-M</sub> εξαιτίας της συν-επιλογής. Η

οριζόντια εξάπλωση των γονιδίων *bla*<sub>CTX-M</sub> μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους ή διαφορετικών ειδών εντεροβακτηριακών προωθείται σε μεγάλο βαθμό από τα πλασμίδια, που είναι συχνά αυτοσυζευκτικά και μεταφέρουν επιπλέον στοιχεία αντοχής (Bonnet R, 2004).

Υπάρχει μία δραματική αύξηση στον αριθμό των CTX-Ms ενζύμων και των οργανισμών που τις παράγουν. Οι CTX-Ms έχουν γίνει οι πιο συχνές ESBLs παγκοσμίως. Η επικράτηση αυτή έχει παρατηρηθεί όχι μόνο στο νοσοκομειακό περιβάλλον αλλά και στην κοινότητα (Valverde A, 2004), (Romero L, 2005). Επιπλέον, ένζυμα CTX-M έχουν εντοπιστεί σε κατοικίδια ζώα, σε εκτρεφόμενα ζώα και προϊόντα της διατροφικής αλυσίδας (Romero L, 2005), (Pitout JDD, 2005), (Kojima A, 2005), (Carattoli A, 2005).

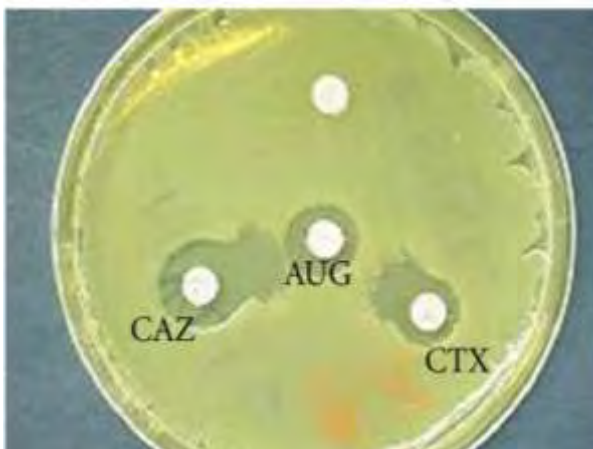
#### 4.3.1.4 OXA ESBLs

Οι β-λακταμάσες τύπου OXA ονομάστηκαν έτσι λόγω της ικανότητας τους να υδρολύουν την οξακιλλίνη. Οι β-λακταμάσες αυτές (λειτουργική ομάδα 2d) χαρακτηρίζονται από επίπεδα υδρόλυσης κλοξακιλλίνης και οξακιλλίνης 50% υψηλότερα απ' ό,τι για την βενζυλπενικιλίνη (Bush K, 1995). Κυρίως εντοπίζονται σε *Pseudomonas aeruginosa* (Weldhagen GF, 2003), όμως έχουν βρεθεί και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια. Στην πραγματικότητα, η πιο κοινή β-λακταμάση τύπου OXA έχει βρεθεί σε 1-10% των στελεχών *E. coli* (Livermore DM, 1995). Οι περισσότερες β-λακταμάσες τύπου OXA δεν υδρολύουν σε σημαντικό βαθμό τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και δεν θεωρούνται ESBLs. Ωστόσο, η OXA-10 υδρολύει (ασθενώς) την κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, και την αζτρεονάμη, προσδίδοντας τους περισσότερους οργανισμούς μειωμένη ευαισθησία σε αυτά τα αντιβιοτικά. Άλλες OXA ESBLs περιλαμβάνουν: OXA-11, -14, 15, -16, -17, -18, -19, -28, -31, -32, -35, και -45 (Toleman MA, 2003). Αυτές παρέχουν αντοχή στην κεφοταξίμη και μερικές φορές στην αζτρεονάμη (Danel F, 1999), (Danel F, 1995), (Danel F, 1997), (Danel F, 1998), (Hall LM, 1993), (Toleman MA, 2003). Η ταυτόχρονη παραγωγή ενός μεταλλο-ενζύμου που υδρολύει καρβαπενέμες και ενός ενζύμου OXA που υδρολύει την αζτρεονάμη οδηγεί σε αντοχή για όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Toleman MA, 2003). Οι ESBLs τύπου OXA ανακαλύφθηκαν αρχικά σε στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* από ένα νοσοκομείο στην Άγκυρα, Τουρκία. Στην Γαλλία, ένα καινούργιο παράγωγο της OXA-10 (αριθμημένο OXA-28) βρέθηκε σε

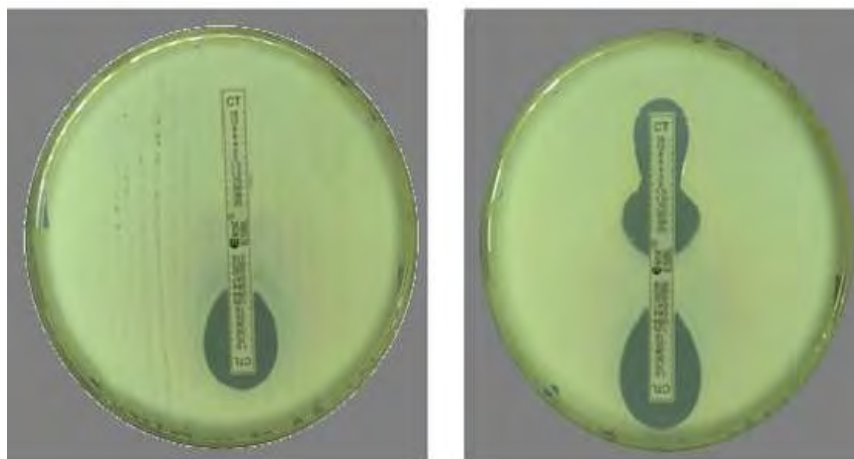
στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* (Poirel L, 2001). Μια καινούργια ESB� (OXA-18) και ένα παράγωγο εκτεταμένου φάσματος της στενού φάσματος OXA-13 β-λακταμάσης (αριθμημένο OXA-19) έχουν επίσης ανακαλυφθεί στη Γαλλία σε στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* (Philippon LN, 1997). Η εξέλιξη των β-λακταμασών τύπου OXA από τα μητρικά ένζυμα με στενότερο φάσμα έχει πολλές ομοιότητες με την εξέλιξη των SHV και TEM ESB�s.

#### 4.3.2 Εργαστηριακή διάγνωση των ESB�s

Η εργαστηριακή διάγνωση των ESB�s είναι περίπλοκη. Στην ουσία, τα περισσότερα κλινικά διαγνωστικά εργαστήρια ανιχνεύουν τους οργανισμούς που παράγουν ESB�s με φαινοτυπικά τεστ, τα οποία απαιτούν δύο βήματα: τον αρχικό έλεγχο, που ακολουθείται από τον επιβεβαιωτικό έλεγχο. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τον έλεγχο του οργανισμού για αντοχή σε μια κεφαλοσπορίνη δείκτη. Η κεφοδοξίμη χρησιμοποιείται ευρέως καθώς υδρολύεται από τους TEM-, SHV- και CTX-M-τύπους, αλλά και άλλες κεφαλοσπορίνες όπως η κεφοταξίμη, η κεφτριαξόνη και η κεφταζιδίμη χρησιμοποιούνται επίσης (Drieux L, 2008). Για την επιβεβαίωση παρουσίας μιας ESB�, πρέπει να αποδειχθεί η συνέργια μεταξύ της κεφαλοσπορίνης δείκτη και του κλαβουλανικού οξέος (οι ESB�s αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ) (Drieux L, 2008). Υπάρχουν πολλά εμπορικά εργαλεία διαθέσιμα για το σκοπό αυτό: η συνέργια διπλού δίσκου (**Εικόνα 11**), η μέθοδος συνδυασμού δίσκου και ειδικές ESB� E-tests (**Εικόνα 12**) (Drieux L, 2008), (Wiegand I, 2007).



**Εικόνα 11.** Μέθοδος συνέργειας διπλού δίσκου για την ανίχνευση ενός στελέχους που παράγει ESB�. Στην περιοχή ανάμεσα στο δισκίο αντιβιοτικού (CAZ ή CTX) και το δισκίο AUG που περιέχει αμοξυκιλλίνη με κλαβουλανικό οξύ υπάρχει διεύρυνση της ζώνης αναστολής επειδή στο σημείο αυτό υπάρχει συνδυασμός του αντιβιοτικού με το κλαβουλανικό οξύ λόγω της διάχυσής τους από τα αντίστοιχα δισκία.



**Εικόνα 12.** Ανίχνευση ESBL με ειδικές ESBL-E-test. Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η ζώνη αναστολής που προκύπτει όταν το αντιβιοτικό συνδυάζεται με το κλαβουλανικό οξύ (CTL), ενώ στη δεξιά εικόνα εκτός της μεγαλύτερης ζώνης αναστολής παρουσία κλαβουλανικού οξέος παρατηρείται μια διεύρυνση της ζώνης αναστολής στις χαμηλές συγκεντρώσεις του σκέτου αντιβιοτικού λόγω διάχυσης του κλαβουλανικού οξέος από την πλευρά της ταινίας που περιέχει το συνδυασμό του με το αντιβιοτικό.

Ωστόσο, αν το στέλεχος παράγει επιπλέον και AmpC ή μεταλλο-β-λακταμάση (που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ), οι μέθοδοι αυτές χάνουν την ευαισθησία τους (Wiegand I, 2007). Ο αρχικός έλεγχος όπως και ο επιβεβαιωτικός έλεγχος ενός οργανισμού που παράγει ESBL μπορεί να είναι τεχνικά δύσκολοι και χρονοβόροι και αυτό μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα όταν ο χρόνος για το κατάλληλο αντιβιοτικό είναι ζωτικής σημασίας στη διαχείριση ενός ασθενή με σηψαιμία.

Μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συχνά είναι η ενίσχυση με PCR των ESBL γονιδίων με εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων και στη συνέχεια η αλληλούχιση του προϊόντος. Και άλλες μοριακές μέθοδοι που δεν χρησιμοποιούν την αλληλούχιση έχουν αναπτυχθεί για τον χαρακτηρισμό των ESBLs και συμπεριλαμβάνουν τη PCR με RFLP, αντίδραση λιγάσης, real-time PCR κ.α. Ωστόσο, Η PCR ακολουθούμενη από την αλληλούχιση παραμένει μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση ειδικών μεταλλάξεων των γονιδίων β-λακταμασών.

Νεότερες τεχνολογίες όπως τροποποιήσεις της φασματομετρίας μάζας (matrix assisted light desorption ionization time-of-flight; MALDITOF) προβάλλονται ως ταχύτερες εναλλακτικές για τη συμβατική εργαστηριακή διάγνωση.



### 4.3.3 Επιδημιολογία των ESBLs

Όταν οι ESBLs αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά, στις αρχές του 1980, διαπιστώθηκε ότι προέρχονταν από σημειακές μεταλλάξεις των ευρέως φάσματος TEM και SHV ενζύμων οι οποίες προκαλούσαν αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Knothe H, 1983), (Kliebe C, 1985). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά είχαν ως αποτέλεσμα την υψηλή υδρολυτική ικανότητα των ενζύμων αυτών για τις β-λακτάμες εξαιτίας των χαμηλών τιμών  $K_m$  (υψηλή συγγένεια) για τις ενώσεις αυτές (Knott-Hunziker V, 1982). Τα ένζυμα αυτά έχουν γίνει μια σημαντική αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων, ειδικά στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) (Falagas ME, 2009), (Pitout JDD, 2005).

Οι TEM-και SHV-τύποι έχουν αναγνωριστεί παγκοσμίως με πάνω από 100 μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί ότι προσφέρουν αντοχή στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος. Μελέτες σε ΗΠΑ και Ευρώπη έχουν δείξει ότι οι SHV-4 και SHV-5 είναι οι πιο συχνοί τύποι, ενώ οι επικρατέστεροι TEM-τύποι στις ΗΠΑ (TEM-10, TEM-12, TEM-26) είναι διαφορετικοί από αυτούς στην Ευρώπη (TEM-3, TEM-24) (Chanal C, 1996), (Yuan M, 1998). Ωστόσο, η TEM-10 έχει αναφερθεί με την ίδια συχνότητα στην Πορτογαλία και το Ηνωμένο Βασίλειο (Bradford PA, 2001), (Barroso H, 2000), (Liu PYF, 1992). Εστίες από TEM-47 στην Πολωνία και TEM-52 στην Κορέα έχουν επίσης αναφερθεί, ενώ η SHV-5 β-λακταμάση απαντάται παγκοσμίως, με αναφορές από Γαλλία, Κροατία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Πολωνία, το Ηνωμένο Βασίλειο, ΗΠΑ και Νότια Αφρική (Bradford PA, 2001). Φαίνεται ότι οι ESBLs εμφανίζονται και διαδίδονται τοπικά, αλλά η εξάπλωση συγκεκριμένων τύπων ESBL ή στελεχών που παράγουν ESBL μπορεί να συμβεί μεταξύ νοσοκομείων που ανταλλάσσουν ασθενείς.

Από τις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα έχει λάβει χώρα μια στροφή στην γονοτυπική επικράτηση των ESBLs. Ο CTX-M γονότυπος, που προέρχεται από χρωμοσωμικά κωδικοποιημένα ένζυμα των *Kluyvera spp.*, έχει ανέλθει στο προσκήνιο, ειδικά σε *E. coli* και *K. pneumonia* (Falagas ME, 2009), (Pitout JDD, 2005), (Livermore DM, 2005). Πιστεύεται ότι τα γονίδια αυτά συζεύχθηκαν σε πλασμίδια με την ικανότητα να κινούνται ανάμεσα σε διαφορετικούς βακτηριακούς πληθυσμούς απ' όπου μεταφέρθηκαν σε παθογόνα είδη, (Bonnet R, 2004). Τα CTX-M ένζυμα φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να εξαπλωθούν και να προκαλούν επιδημικές εξάρσεις. Υπάρχουν παραπάνω από 50 παραλλαγές των CTX-M ενζύμων μέχρι σήμερα και έχουν συσχετιστεί με πολλές επιδημικές εξάρσεις σε νοσοκομεία και σε κοινότητα

(Falagas ME, 2009), (Livermore DM, 2005). Στοιχεία των 10 τελευταίων ετών καθιερώνουν το γονότυπο CTX-M ως τον επικρατέστερο στην Ευρώπη και την Ανατολική Ασία (Dhillon RH, 2012).

### **Παγκόσμια επιδημιολογία**

Ο επιπολασμός των βακτηρίων που παράγουν ESBLs ποικίλλει παγκοσμίως, με αναφορές από τη Βόρεια Αμερική, Νότια Αμερική, Ευρώπη, Αφρική, και Ασία (Bonnet R, 2004). Στοιχεία από την παγκόσμια βάση δεδομένων για την δοκιμή επιτήρησης και αξιολόγησης τιγκεκυκλίνης [Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST)] δείχνουν ότι το επίπεδο παραγωγής των ESBLs ήταν υψηλότερος ανάμεσα σε στελέχη *K. pneumoniae* που συλλέχθηκαν στην Λατινική Αμερική, ακολουθούμενη από την Ασία/Νοτιοανατολική Ασία (Ειρηνικό), την Ευρώπη, και τη Βόρεια Αμερική (44.0 %, 22.4 %, 13.3 % και 7.5 % αντίστοιχα) (Falagas ME, 2009), (Reinert RR, 2007).

**ΗΠΑ.** Οι πρώτες αναφορές για ESBLs στις ΗΠΑ στα τέλη της δεκαετίας του 1980 ήταν σχετικά με τον TEM-τύπο (Quinn JP, 1989) και τα πιο συχνά ένζυμα εμφανίζονταν να είναι οι SHV και TEM, με μια μικρή εμφάνιση των CTX-M (Bush K, 2008). Ο επιπολασμός των ESBLs και οι τύποι που εμπλέκονται στις ΗΠΑ είναι και τα δύο σε πλήρη αντίθεση με την επιδημιολογία που παρατηρείται στο υπόλοιπο κόσμο, συμπεριλαμβάνοντας τον Καναδά όπου έχουν παρατηρηθεί επιδημικές εξάρσεις που οφείλονται σε *K. pneumoniae* οι οποίες παράγουν CTX-M β-λακταμάση (Melano RG, 2006). Η θέση γειτνίασης των ΗΠΑ με τον Καναδά θα υποδήλωνε ότι η εξάπλωση των CTX-M-τύπων νότια των συνόρων είναι μια πραγματική απειλή. Πράγματι, μια πρόσφατη αναφορά εφιστά την προσοχή στην εμφάνιση των CTX-M-τύπων σε σύστημα υγειονομικής περίθαλψης στις ΗΠΑ (Lewis JS, 2007).

Στοιχεία από αρκετές μελέτες επιτήρησης που έχουν διεξαχθεί από το Σύστημα Υγείας στις ΗΠΑ παρέχουν μια ευρύτερη εικόνα των επιπέδων επιπολασμού (Bush K, 2008). Η έκθεση εθνικών συστημάτων επιτήρησης νοσοκομειακών λοιμώξεων που εκδόθηκε τον Οκτώβριο του 2004 από το CDC σύγκρινε στοιχεία από νοσοκομειακές λοιμώξεις από αρκετά κέντρα σε όλες τις ΗΠΑ (National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, 2004) σε Μονάδες Εντατικής θεραπείας και μη. Τα επίπεδα της *K. pneumoniae* ανθεκτικής στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς αυξήθηκαν κατά 43 % το 2003, συγκριτικά με στοιχεία από το 1998 έως το 2002. Τα επίπεδα ανθεκτικών *E. coli* δεν άλλαξαν. Όταν τα επίπεδα αντοχής συγκεντρώθηκαν

απ' όλες τις ΜΕΘ (συμπεριλαμβάνοντας ενήλικες, παιδιατρικό, και καρδιοθωρακικό), το ποσοστό των ανθεκτικών *K. pneumonia* αντιστοιχούσε σε 6.2% των στελεχών, ενώ για τις ανθεκτικές *E. coli* ήταν χαμηλότερο, στο 1.3 % όλων των στελεχών *E. coli* από τους ασθενείς των ΜΕΘ συγκριτικά με το 5.8 % και 1.5 %, αντίστοιχα, σε μονάδες εκτός από τη ΜΕΘ. Στα τέλη της δεκαετίας του 1990, η μελέτη SENTRY ανάλυσε στελέχη κατά τη διάρκεια μιας 12μηνιας περιόδου και έδειξε ένα υψηλότερο ποσοστό των ESBLs στα στελέχη *K. pneumonia* σε κέντρα των ΗΠΑ συγκριτικά με κέντρα στον Καναδά (7.6 % έναντι 4.9 %), ενώ σχετικά με τις *E. coli* που παράγαν ESBLs δεν υπήρχαν διαφορές (Winokur PL, 2001). Πιο πρόσφατα δεδομένα από το πρόγραμμα MYSTIC (που εξέτασε την παραγωγή των ESBLs από στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* για μια περίοδο 5 χρόνων (1999-2004) έδειξε ένα χαμηλό επίπεδο επιπολασμού των ESBLs, με λιγότερο του 1.5 % των στελεχών *E. coli* που παράγουν ESBLs από 2001-2004. Ένα παρόμοιο χαμηλό επίπεδο παρατηρήθηκε και σε *Klebsiella* spp. κατά τη διάρκεια της ίδιας περιόδου, με 2.4 % - 4.4 % των στελεχών να παράγουν τα ένζυμα (Goossens H, 2005). Αυτοί οι χαμηλοί αριθμοί επιβεβαιώνονται και από στοιχεία του CDC που εξέτασε κυρίως νοσοκομειακές λοιμώξεις, με τις ESBLs να ευθύνονται για το 0.5-1 % αυτών των λοιμώξεων (Hidron AI, 2008).

**Ευρώπη.** Στην Ευρώπη, τα *Εντεροβακτηριακά* που παράγουν ESBLs έχουν εξαπλωθεί σε έναν ανησυχητικό βαθμό. Παρόλο που υπάρχει εκτενή διαφορά ανάμεσα στις ευρωπαϊκές χώρες, σχεδόν κάθε ευρωπαϊκή χώρα αντιμετώπισε επιδημικές εξάρσεις με οργανισμούς που παράγουν ESBLs (Paterson DL, 2005).

Το πρώτο στέλεχος εντοπίστηκε στη Γερμανία (Knothe H, 1983) και το Ηνωμένο Βασίλειο; ωστόσο, η πρώτη μεγάλη επιδημία παρατηρήθηκε στη Γαλλία όπου πάνω από 50 ασθενείς σε μια μονάδα εντατικής θεραπείας προσβλήθηκαν και υπήρξε εξάπλωση σε και σε άλλες πτέρυγες του νοσοκομείου (Brun-Buisson C, 1987). Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 και 1990 οι TEM και οι SHV ESBLs ήταν οι επικρατέστεροι τύποι. Ήταν σχεδόν αποκλειστικά από νοσοκομειακές λοιμώξεις και σχετίζονταν με νοσοκομειακές επιδημίες, κυρίως σε ΜΕΘ (Cantón R, 2008). Ο ρόλος αυτός της ΜΕΘ ως πηγή επιδημικών εξάρσεων προκαλούμενων από ESBLs συχνά αναγνωρίζεται ως στοιχείο επιδημιολογίας των οργανισμών αυτών (Falagas ME, 2009), (Pitout JDD, 2005). Στοιχεία από το Ευρωπαϊκό Σύστημα Επιτήρησης Αντιβιοτικής Αντοχής επιβεβαιώνουν την αυξανόμενη επικράτηση των ESBLs σ' όλη την Ευρώπη (**Εικόνα 13**).

Proportion of 3rd gen. oeph. resistant  
*E. coli* isolates in participating countries  
in 2006, 2007 (c) EARSS



Figure 13: *Escherichia coli*: percentage (%) of invasive isolates with resistance to third-generation cephalosporins by country, EU/EEA countries, 2006



**Εικόνα 13.** Στοιχεία από το Ευρωπαϊκό Σύστημα Επιτήρησης Αντιμικροβιακής Αντοχής σχετικά με το ποσοστό ανθεκτικών στελεχών *E. coli* στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες, για τα έτη 2006-2007 και 2011.

Παρουσιάζει ενδιαφέρον η μικρή πτώση στον αριθμό των *K. pneumoniae* που παράγουν ESBLs στην Δυτική Ευρώπη, πιθανόν εξαιτίας των ενισχυμένων πρακτικών στον έλεγχο λοιμώξεων και την αντιμικροβιακή διαχείριση (Carbonne A, 2002). Ωστόσο, αυτό δεν αληθεύει για την Ανατολική Ευρώπη, όπου οι αριθμοί των ανθεκτικών στελεχών φαίνεται να αυξάνονται (Sekowska A, 2002). Σύμφωνα με την ετήσια επιδημιολογική έκθεση πάνω στις μεταδοτικές ασθένειες στην Ευρώπη 2010 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2010), οι *E. coli* έδειξαν μια πανευρωπαϊκή αύξηση στην αντοχή σε όλα τα αντιβιοτικά υπό επιτήρηση. Η εντυπωσιακή εξάπλωση των CTX-M ενζύμων είχε ως αποτέλεσμα μια αλλαγή στην κατανομή των ESBL τύπων σε όλη την Ευρώπη; σήμερα, οι CTX-M και οι TEM ESBLs είναι οι κύριοι τύποι (Coque TM, 2008). Επιπλέον, και στην κοινότητα οι οργανισμοί που παράγουν ESBLs και προκαλούν λοιμώξεις ουροποιητικού παρουσιάζουν μια ανησυχητική αύξηση σε αριθμό (Cantón R, 2008). Επανειλημμένως έχει φανεί ότι τα επίπεδα των ESBLs στην Ευρώπη είναι υψηλότερα από αυτά στις ΗΠΑ, αλλά χαμηλότερα από τη Λατινική Αμερική και την Ασία.

**Νότια Αμερική.** Τα επίπεδα των ESBLs στη Νότια Αμερική κατατάσσονται ανάμεσα στα υψηλότερα στον κόσμο, με επικρατέστερη την CTX-M β-λακταμάση. Στοιχεία

από επιτηρήσεις αποκαλύπτουν ανησυχητικά υψηλά επίπεδα επιπολασμού, με τα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν ESBLs από την Λατινική Αμερική να κυμαίνονται από 45 % έως 51 % (Winokur PL, 2001). Παρόμοια, υψηλά επίπεδα έχουν παρατηρηθεί και ανάμεσα σε στελέχη *E. coli* στην Λατινική Αμερική με τιμές που κυμαίνονται από 8.5 έως 18 % (Turner PJ, 1999). Υπάρχουν πολλοί λόγοι γι' αυτόν τον υψηλό επιπολασμό σε αυτό το μέρος του κόσμου. Σίγουρα, υπάρχουν πληθώρα στοιχείων που να υποδηλώνουν ότι η εξάπλωση των ESBL λοιμώξεων είναι μεγαλύτερη σε χώρες με φτωχούς πόρους (Casellas J. M, 1999), (Sader HS, 2004). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε φτωχότερες κοινωνικές και οικονομικές συνθήκες, νοσοκομειακό συνωστισμό, έλλειψη αντιμικροβιακής διαχείρισης, υπερβολική χρήση αντιβιοτικών και τις μη υποστηριζόμενες πρακτικές ελέγχου λοιμώξεων (Villegas MV, 2008).

**Ασία.** Στην Ασία, παρατηρούνται υψηλά επίπεδα *Εντεροβακτηριακών* που παράγουν ESBLs. Το γεγονός αυτό επισημάνθηκε πρώτα από το πρόγραμμα αντιμικροβιακής επιτήρησης SENTRY 1998-1999 (Bell JM, 2002). Σαφώς σε μια τόσο μεγάλη περιοχή, έχει παρατηρηθεί μία μεγάλη διακύμανση στα επίπεδα επιπολασμού και τους γονοτύπους ESBL. Για παράδειγμα, στην Κίνα, η συχνότητα των ESBLs που παράγονται από στελέχη *E. coli* κυμαινόταν από 13 % - 15 %, με ακόμη υψηλότερα επίπεδα ανάμεσα σε στελέχη *K. pneumoniae* (> 20%, με ένα κέντρο να αναφέρει πάνω από 60 %) (Bell JM, 2002). Οι πρώτες αναφορές από Ιαπωνία και Ταϊβάν αναφέρουν ότι ο SHV-τύπος έπαιξε σημαντικό ρόλο αρχικά, αλλά όπως και στην ηπειρωτική Ευρώπη, η εξάπλωση του CTX-M γονοτύπου τον καθιστά ως τον επικρατέστερο, με εθνικές και περιφερειακές διακυμάνσεις (Hawkey PM, 2008).

**Αφρική.** Σε σύγκριση με τον υπόλοιπο κόσμο, υπάρχει μια έλλειψη δεδομένων αναφορικά με τα *Εντεροβακτηριακά* που παράγουν ESBLs στις αφρικανικές χώρες. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που επισημαίνουν την επικράτηση των ESBLs στην Αφρική. Έχει αναγνωριστεί ότι η Αίγυπτος έχει ένα εξαιρετικά υψηλό επίπεδο των οργανισμών που παράγουν ESBLs, με μέχρι και 70 % των στελεχών να παράγουν το ένζυμο (Borg MA, 2006). Σε μία μελέτη που σύγκρινε δεδομένα από Αίγυπτο, Λίβανο, Σαουδική Αραβία και Νότια Αφρική, η Αίγυπτος βρέθηκε να έχει τα υψηλότερα επίπεδα των ESBLs (Bouchillon SK, 2004). Ο γονότυπος CTX-M φαίνεται να είναι ο πιο κοινός τύπος ESBL στη βόρεια Αφρική (Khalaf NG, 2009). Έχουν υπάρξει αναφορές επίσης για CTX-M *K. pneumoniae* στην Κένυα (Kariuki S, 2001) και SHV- και TEM-τύπους στη Νότια Αφρική (Essack SY, 2001).

Επίσης, διαφορετικές οικογένειες CTX-M φαίνεται να επικρατούν σε διαφορετικές περιοχές: η CTX-M-15 ομάδα επικρατεί στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, τη Βόρεια Αμερική, τη μέση Ανατολή και την Ινδία, όμως η CTX-M-14 (ομάδα 9) βρίσκεται πιο συχνά στην Κίνα, τη Νοτιοανατολική Ασία, την Ισπανία και η CTX-M-2 (ομάδα 2) επικρατεί στην Αργεντινή, το Ισραήλ, και την Ιαπωνία (Hawkey PM, 2008), (Bush K, 2008). Η επιδημιολογία των CTX-M ESBLs συσχετίζεται με την εξάπλωση μέσω πλασμιδίων όπως και την κλωνική επιτυχία.

Πολλοί μικροοργανισμοί που παράγουν ESBLs είναι πολυανθεκτικοί σε μη-β-λακταμικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβάνοντας τις φθοριοκινολόνες και τις αμινογλυκοσίδες (Hawkey PM, 2008), (Livermore DM, 2007), (Paterson DL, 2006). Η αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά όπως την τριμεθοπρίμη, τις τετρακυκλίνες, τις σουλφοναμίδες, και τη χλωραμφαινικόλη καθώς και στις αμινογλυκοσίδες συχνά κωδικοποιείται από το ίδιο πλασμίδιο που κωδικοποιεί τις ESBLs (Karisik E, 2006).

Τα υψηλά επίπεδα των οργανισμών που παράγουν ESBLs στον αναπτυσσόμενο κόσμο είναι σαφώς ανησυχητικά; Η έλλειψη κονδυλίων για αποτελεσματικό έλεγχο λοιμώξεων και η περιορισμένη πρόσβαση στα αποτελεσματικά αντιβιοτικά έχει σαφείς επιπτώσεις στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα που σχετίζονται με αυτές τις λοιμώξεις.

## **4.4 Καρβαπενεμάσες**

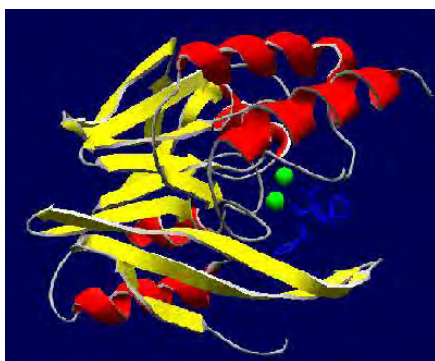
Είναι η πιο ευέλικτη οικογένεια β-λακταμασών, με ένα εύρος φάσματος πολύ ευρύτερο από ό,τι τα άλλα ένζυμα που υδρολύουν τις β-λακτάμες. Αναγνωρίζουν σχεδόν όλες τις υδρολυόμενες β-λακτάμες, και οι περισσότερες είναι ανθεκτικές στους εμπορικά διαθέσιμους αναστολείς β-λακταμασών. Συμπεριλαμβάνουν ένζυμα από τις μοριακές τάξεις A (χρωμοσωμικές: SME, NMC και IMI, πλασμιδιακές KPC, GES), B (μεταλλο-β-λακταμάσες) και D (OXA). Οι πιο σημαντικές και συχνά απαντώμενες είναι οι μεταλλο-β-λακταμάσες VIM-τύπου και οι KPC καρβαπενεμάσες.

### **4.4.1 Καρβαπενεμάσες τάξης B (Μεταλλο-β-λακταμάσες)**

Παρόλο που τα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταλλο-β-λακταμάσες δείχνουν μία πολύ μικρή ομοιότητα στην πρωτογενή δομική αλληλουχία τους (17 - 37%), οι

τρισδιάστατες δομές των γνωστών μεταλλο-β-λακταμασών είναι παρόμοιες και παρουσιάζουν επίσης παρόμοιες κινητικές ιδιότητες υδρολύοντας αποτελεσματικά τις περισσότερες β-λακτάμες, συμπεριλαμβάνοντας και τις καρβαπενέμες. Είναι ανθεκτικές στην αδρανοποίηση από το κλαβουλανικό οξύ, την σουλβακτάμη και την ταζοβακτάμη. Η αζτρεονάμη δεν υδρολύεται και δεν δρα ως αναστολέας.

Τα ένζυμα αυτά έχουν μία δομή αβ/βα «σάντουιτς», με 2 β-πτυχωτά φύλλα στο κέντρο και 5 α-έλικες στην εξωτερική επιφάνεια. Το β-πτυχωτό φύλλο αποτελείται από 5 αντιπαράλληλες αλυσίδες (Εικόνα 14). Το μόριο της μεταλλο-β-λακταμάσης αποτελείται από δύο τμήματα που ενώνονται με μία αγκύλη που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 191 – 200. Το πρώτο τμήμα περιλαμβάνει το πολύ διατηρημένο μοτίβο His116-X-His118-X-Asp120 των προσδετών του ψευδάργυρου.



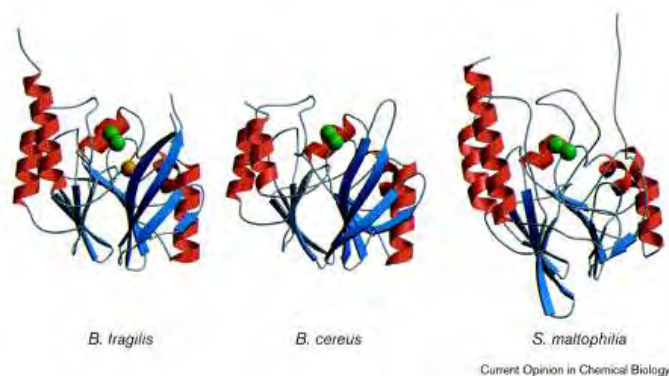
Εικόνα 14. Δομή μεταλλο-β-λακταμάσης.

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες χρειάζονται ιόντα  $Zn^{2+}$  ή κάποιο άλλο βαρύ μέταλλο για την καταλυτική δράση τους και η δραστηρότητά τους αναστέλλεται από χηλικούς παράγοντες. Τα συντηρημένα κατάλοιπα που δεσμεύουν ψευδάργυρο δείχνουν ότι όλες οι μεταλλο-β-λακταμάσες έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν δύο ιόντα  $Zn^{2+}$ . Όμως, στην πραγματικότητα κάποιες χρειάζονται δύο ιόντα Zn για την μέγιστη υδρολυτική τους δράση, με τα δύο ιόντα να δεσμεύονται είτε το ίδιο ισχυρά είτε το ένα πιο ισχυρά από το άλλο, (όπως π.χ. στο *B. Fragilis*, *B. Cereus*), ενώ άλλες μεταλλο-β-λακταμάσες χρειάζονται μόνο ένα ιόν  $Zn^{2+}$  για την μέγιστη δραστηρότητά τους και η δέσμευση ενός δεύτερου ιόντος απενεργοποιεί το ένζυμο (όπως στην *Aeromonas hydrophila*).

Το διπύρρηνο κέντρο δέσμευσης  $Zn^{2+}$  κάθε ενζύμου βρίσκεται στη βάση μιας ευρείας επιφανειακής εσοχής ανάμεσα στα δύο β-φύλλα (Εικόνα 15). Λόγω αυτής της εύκολα προσβάσιμης τοποθέτησης, το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών μπορεί να δέχεται μόρια διάφορων β-λακταμικών ενώσεων, παρέχοντας έτσι τη δομική βάση για



την ευρεία ειδικότητα υποστρώματων που παρουσιάζουν. Οι μικρές διαφοροποιήσεις στα κέντρα Zn και δέσμευσης υποστρώματος καθορίζουν την καταλυτική τους αποτελεσματικότητα για διάφορα υποστρώματα.



**Εικόνα 15.** Θέση δέσμευσης ιόντων Zn<sup>2+</sup> στις μεταλλο-β-λακταμάσες.

Η τάξη B των β-λακταμασών διαιρείται σε τρεις διαφορετικές υποτάξεις:

**Υποτάξη B1:** χαρακτηρίζεται από την θέση δέσμευσης ψευδαργύρου 1, που αποτελείται από τρία κατάλοιπα ιστιδίνης και μία θέση δέσμευσης ψευδαργύρου 2, που αποτελείται από μία Hys, μία Cys και μία Asp. Περιλαμβάνει:

- την μεταλλο-β-λακταμάση II από το *Bacillus cereus*.
- την CcrA β-λακταμάση από το *Bacteroides fragilis*
- την BlaB β-λακταμάση από *Chryseobacterium indologenes*
- την IMP β-λακταμάση που έχει βρεθεί σε κλινικά στελέχη των *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae* και *A. baumannii*.
- τις VIM β-λακταμάσες που έχουν βρεθεί σε ποικίλα στελέχη *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae* κλπ.

**Υποτάξη B2:** χαρακτηρίζεται από την θέση δέσμευσης Zn1, με την μία από τις ιστιδίνες να αντικαθίσταται από ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης. Η θέση δέσμευσης ψευδαργύρου 2 είναι μη τροποποιημένη σε σύγκριση με την υποτάξη B1. Περιλαμβάνει:

- τις CphA, ImiS και CphA2 β-λακταμάσες που παράγονται από διάφορα είδη της *Aeromonas*.
- την Sfh-I β-λακταμάση από την *Serratia fondicola*.

**Υποτάξη B3:** έχει τους ίδιους προσδέτες στην θέση δέσμευσης Zn1 με την υποτάξη B1, αλλά το κατάλοιπο κυστεΐνης που υπάρχει στη θέση δέσμευσης 2, στις υποτάξεις B1 και B2, έχει αντικατασταθεί με ιστιδίνη. Περιλαμβάνει:



- την L1 β-λακταμάση από *S. maltophilia*.
- την GOB β-λακταμάση από *C. meningosepticum*.
- την FEZ-1 β-λακταμάση από *Legionella gormanii*.
- την THIN-B β-λακταμάση από *Janthinobacterium lividum*.

#### 4.4.1.2 Μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM

Τα γονίδια τύπου VIM μεταφέρονται ως κασέτες γονιδίων από ιντεγρόνια κλάσης 1. Οι παραλλαγές του γονιδίου αυτού μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις ομάδες που αντιπροσωπεύονται από το VIM-1, VIM-2 και VIM-7. Η ομάδα VIM-1 περιλαμβάνει επίσης το VIM-4, το VIM-5 και το VIM-11A. Έξι παραλλαγές του VIM θεωρούνται παράγωγα του VIM-2 και είναι το VIM-3, -6, -8, -9, -10 και -11B. Το VIM-7 αποκλίνει φανερά από τους υπόλοιπους τύπους VIM, παρουσιάζοντας μία ομοιότητα 77% με το VIM-1, ενώ τα άλλα ένζυμα διαφέρουν μεταξύ τους λιγότερο από 11%. Έχει περιγραφεί από την ερευνητική μας ομάδα και μία «υβριδική» VIM μεταλλο-β-λακταμάση, η VIM-12, που το ένα μισό της είναι όμοιο με της VIM-1 και το άλλο με της VIM-2.

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες που κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία βρίσκονται σε γενετικά μεταθετά στοιχεία, όπως αυτά τύπου VIM, αποτελούν μία μεγαλύτερη κλινική απειλή από τα ένζυμα που κωδικοποιούνται χρωμοσωμικά, καθώς τα γονίδια αυτά έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων, ακόμη και διαφορετικού γένους. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM περιγράφηκαν πρώτα στην *P. aeruginosa* και στη συνέχεια σε μία σειρά από Gram αρνητικά αζυμωτικά και σε κάποια εντεροβακτηριακά είδη όπως *E. coli*, *K. pneumoniae* και *E. cloacae*. Οι τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι οι μικροοργανισμοί που παράγουν λακταμάσες τύπου VIM είναι ενδημικοί σε διάφορες Μεσογειακές χώρες, συμπεριλαμβάνοντας και την Ελλάδα. Η ανησυχία για την εμφάνιση των επίκτητων αυτών μεταλλο-β-λακταμασών σε κλινικά στελέχη σημαντικών Gram-αρνητικών παθογόνων, όπως μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas*, προκύπτει από το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που μπορούν να υδρολύουν, συμπεριλαμβάνοντας και τις καρβαπενέμες, όπως και την αντίστασή τους στους αναστολείς λακταμασών.

#### 4.4.2 KPC καρβαπενεμάσες

Οι KPC καρβαπενεμάσες ανήκουν στην μοριακή κλάση A β-λακταμασών (ταξινόμηση κατά Ambler) και είναι καρβαπενεμάσες σερίνης. Με βάση τη λειτουργική ταξινόμηση κατά Bush ανήκουν στην ομάδα 2f. Δύο χαρακτηριστικά ξεχωρίζουν τις KPC καρβαπενεμάσες από τα άλλα ένζυμα της λειτουργικής ομάδας 2f. Πρώτον, τα KPC ένζυμα εντοπίζονται σε μεταφερόμενα πλασμίδια; δεύτερον, το δικό τους φάσμα υδρόλυσης υποστρωμάτων συμπεριλαμβάνει τις αμινοθειαζολόξιμες κεφαλοσπορίνες, όπως την κεφοταξίμη. Παρόλο που οι KPC β-λακταμάσες κυρίως εντοπίζονται σε *K.pneumoniae*, έχουν υπάρξει αναφορές αυτών των ενζύμων σε *Enterobacter spp.* και σε *Salmonella spp.* (Bratu S, 2005), (Hossain A, 2004) (Miriagou V, 2003). Το πρώτο μέλος της KPC οικογένειας ανακαλύφθηκε μέσω του προγράμματος επιτήρησης ICARE σε ένα κλινικό στέλεχος *K. pneumoniae* από τη Βόρεια Καρολίνα το 1996 (Yigit H, 2001). Το στέλεχος ήταν ανθεκτικό σε όλες τις β-λακτάμες που ελέγχθηκαν, όμως οι MICs στις καρβαπενέμες μειώνονταν παρουσία του κλαβουλανικού οξέος. Η δραστηριότητα καρβαπενεμάσης, που αρχικά ανιχνεύτηκε με μια βιοδοκιμή, σχετίστηκε με ένα μεγάλο πλασμίδιο που κωδικοποιούσε την KPC-1 β-λακταμάση.

Η ανακάλυψη της KPC-1 σύντομα ακολουθήθηκε από μια σειρά αναφορών, μιας παραλλαγής που διέφερε σε ένα μόνο αμινοξύ, της KPC-2 κατά μήκος της ανατολικής ακτής των ΗΠΑ (Yigit H, 2003), (Miriagou V, 2003), (Moland ES, 2003).

Η KPC-2 προσδιορίστηκε πρώτα το 2003 ως αποτέλεσμα μιας σημειακής μετάλλαξης στην KPC-1 και εμφανίστηκε σε τέσσερα στελέχη από τη Βαλτιμόρη με MICs ιμιπενέμης 2 – 8 μg/ml. Το γονίδιο της KPC-2 εντοπιζόταν σε ένα μεταφερόμενο πλασμίδιο, και παρατηρήθηκε ότι ενώ όλα τα στελέχη παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη, κανένα δεν ήταν τεχνικά ανθεκτικό σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας τα εγκεκριμένα από το CLSI (Moland ES, 2003). Στη συνέχεια η KPC-2 περιγράφηκε σε ένα άλλο σημείο της Maryland σε ένα πλασμίδιο στην *Salmonella enteric* (Miriagou V, 2003). Οι γενετικές περιοχές γύρω από την KPC-2 περιείχαν τρία ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης με αλληλουχίες ομόλογες με τρανσποζάσες. Το 2004, άρχισαν να εμφανίζονται στην περιοχή της Νέας Υόρκης αναφορές για την KPC-2, με τις *K. pneumoniae* που εκφράζουν την KPC να αποτελούν ένα ανησυχητικό πρόβλημα (Bratu S, 2005), (Bratu S, 2005). Αυτό ήταν ανησυχητικό διότι η Νέα Υόρκη είχε μεγάλες επιδημικές εξάρσεις με *Klebsiella* που παρήγαγαν ESBLs (Meyer KS, 1993), (Quale JM, 2002) για τις οποίες οι καρβαπενέμες θεωρούνταν μια από τις λίγες

θεραπευτικές επιλογές (Paterson DL, 2005). Όταν πραγματοποιήθηκε ριβοτυπία στα στελέχη που παρήγαγαν KPC-2, η πλειοψηφία των στελεχών ήταν κλωνικά, ακόμη και όταν η επιτήρηση συμπεριέλαβε πολλά νοσοκομεία στην μητροπολιτική περιοχή της Νέας Υόρκης. Ιδιαίτερα, μερικές από αυτές τις αναφορές περιγράφανε ασυμφωνίες στην αναγνώριση κάποιων απ' αυτά τα στελέχη ως ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, επειδή οι MICs στις καρβαπενέμες ήταν μικρότερες από τις εγκεκριμένες MICs για τα όρια ευαισθησίας (Bradford PA, 2004), (Bratu S, 2005), (Bratu S, 2005), (Lomaestro, 2006).

Παράλληλα με την αύξηση των αναφορών για την KPC-2, μια παραλλαγή ενός μόνο αμινοξέος της KPC-2, η KPC-3, αναφέρθηκε από μία *Klebsiella pneumoniae* που προκάλεσε επιδημία από το 2000 έως 2001 στη Νέα Υόρκη (Woodford N, 2004). Το KPC-3 ένζυμο έχει εντοπιστεί επίσης σε *Enterobacter spp.* (Bratu S, 2005) όπου οι MICs για την ιμιπενέμη δεν ήταν επίσης, σταθερά στο επίπεδο της αντοχής. Κινητικές αναλύσεις του ενζύμου KPC-3 έδειξαν ένα προφίλ παρόμοιο με αυτό των KPC-1 και KPC-2, με μία μικρή αύξηση στην υδρόλυση της κεφταζιδίμης (Alba J, 2005). Μετά την ταχεία εξάπλωση της KPC κλάσης των καρβαπενεμασών κατά μήκος της ανατολικής ακτής των ΗΠΑ, άρχισαν να δημοσιεύονται αναφορές απ' όλο τον κόσμο. Μια αναφορά από τη Γαλλία το 2005 τεκμηρίωσε την ύπαρξη της KPC-2 σε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* από ένα ασθενή ο οποίος είχε βρεθεί στη Νέα Υόρκη για ιατρική περίθαλψη (Naas T, 2005). Οι KPC καρβαπενεμάσες έχουν ανιχνευτεί πρόσφατα και στη Σκωτία, KPC-4 (Gen Bank accession no. AY700571), την Κολομβία (Villegas MV, 2006), το Ισραήλ (Navon-Venezia S, 2006), την Κίνα (Wei ZQ, 2007) και την Ελλάδα (Tsakris A, 2008), (Pournaras S, 2009). Επίσης, έχει αναφερθεί και ο πρώτος εντοπισμός της KPC-2 σε πλασμίδιο στην *P. aeruginosa*. Το γεγονός αυτό αποτελεί μία ανησυχητική εξέλιξη στην εξάπλωση αυτής της καρβαπενεμάσης (Villegas MV, 2007).

Τα ένζυμα KPC διαθέτουν τα συντηρημένα μοτίβα του ενεργού κέντρου S-X-X-K, S-D-N, και K-T-G των β-λακταμασών της κλάσης A και έχουν την πλησιέστερη ομολογία αμινοξέων (~ 45%) με τις SME καρβαπενεμάσες. Επιπλέον, οι β-λακταμάσες αυτές έχουν τα συντηρημένα κατάλοιπα C69 και C238 τα οποία σχηματίζουν ένα δισουλφιδικό δεσμό που έχει περιγραφεί για τα ένζυμα SME και NMC/IMI. Η δομή της KPC-2 β-λακταμάσης, συγκρινόμενη με τις καρβαπενεμάσες SME-1 και NMC-A και τις μη-καρβαπενεμάσες TEM-1 και SHV-1, αποκαλύπτει χαρακτηριστικά συντηρημένα μεταξύ των καρβαπενεμασών. Η KPC-2, μαζί με τις

άλλες καρβαπενεμάσες, έχει μια μείωση στο μέγεθος του θύλακα ύδατος και έχει την καταλυτική σερίνη σε πιο ρηχή θέση στη σχισμή του ενεργού κέντρου (Ke W, 2007). Έχει προταθεί ότι ο συνδυασμός των ανεπαίσθητων προσαρμογών στο ενεργό κέντρο των καρβαπενεμασών της κλάσης A, επιτρέπουν την πρόσβαση καρβαπενεμασών στο καταλυτικό κέντρο, με αποτέλεσμα την τροποποιημένη εξειδίκευση των ενζύμων αυτών.

Οι KPC καρβαπενεμάσες υδρολύουν τις β-λακτάμες όλων των κλάσεων, με πιο αποτελεσματική υδρόλυση παρατηρημένη για τη νιτροσεφίνη, την κεφαλοθίνη, την κεφαλοριδίνη, τη βενζυλπενικιλίνη, την αμπικιλίνη, και την πιπερακιλλίνη. Η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη, όπως και η κεφοταξίμη και αζτρεονάμη, υδρολύθηκαν 10 φορές λιγότερο αποτελεσματικά απ' ό,τι οι πενικιλίνες και οι πρώιμες κεφαλοσπορίνες. Ασθενής αλλά μετρήσιμη υδρόλυση παρατηρήθηκε για την κεφοξιτίνη και την κεφταζιδίμη, παρέχοντας στην οικογένεια KPC ένα ευρύ φάσμα υδρόλυσης που συμπεριλαμβάνει τις περισσότερες β-λακτάμες.

Στη λειτουργική ομάδα 2f των καρβαπενεμασών, η οικογένεια KPC έχει την μεγαλύτερη δυνατότητα για εξάπλωση εξαιτίας της εντόπισης της σε πλασμίδια, ειδικά δεδομένου ότι εντοπίζονται πιο συχνά σε *K. pneumoniae*, έναν οργανισμό πασίγνωστο για την ικανότητά του να συσσωρεύει και να μεταφέρει καθοριστικούς παράγοντες αντοχής. Επιπλέον, η κλωνική εξάπλωση που έχει παρατηρηθεί σε διάφορες επιδημίες δείχνει την δυσκολία στον έλεγχο λοιμώξεων σχετικά με τον οργανισμό αυτό (Bradford PA, 2004), (Bratu S, 2005), (Bratu S, 2005), (Bratu S, 2005), (Woodford N, 2004). Πιο ανησυχητικό, είναι το γεγονός ότι η θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτούς τους οργανισμούς είναι εξαιρετικά δύσκολη εξαιτίας της πολυαντοχής τους σε φάρμακα, που έχει ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα θνησιμότητας (Bratu S, 2005).

#### 4.4.3 Ανίχνευση καρβαπενεμασών

##### *MICs*

Η ανίχνευση δραστηριότητας καρβαπενεμάσης σε ένα κλινικό στέλεχος παρουσιάζει ενδιαφέρον για ένα κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο. Η πρώτη αιτία για την υποψία ύπαρξης μιας καρβαπενεμάσης σε ένα κλινικό στέλεχος είναι μια αυξημένη MIC στις καρβαπενέμες. Οι αυξημένες MICs στις καρβαπενέμες είναι γενικά ενδεικτικές για την παραγωγή καρβαπενεμάσης στα Εντεροβακτηριακά, όμως πλήρης αντοχή δεν

παρατηρείται πάντα. Για παράδειγμα, σε μια συλλογή 19 στελεχών *K. pneumoniae*, με MICs στην ιμιπενέμη στο ευαίσθητο εύρος τιμών του 1 – 4 µg/ml, η ύπαρξη μεταλλο-β-λακταμάσης υποδείχθηκε με τη δοκιμή δισκίων με ιμιπενέμη παρουσία και απουσία του EDTA, και επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με PCR ως VIM-1 (Petroπούλου D, 2006). Επίσης, για τις καρβαπενεμάσες σερίνης KPC έχει αναφερθεί ότι είναι δύσκολη η ανίχνευσή τους (Bratu S, 2005), (Bratu S, 2005), (Moland ES, 2003). Συχνά οι καρβαπενεμάσες αυτές σχετίζονται με χαμηλές MICs για την ιμιπενέμη έως και 2µg/ml (Moland ES, 2003), και ένα χαμηλό ενοφθάλμισμα είχε ως αποτέλεσμα χαμηλές MICs με την πρότυπη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό (Bratu S, 2005). Η αντοχή στην ερταπενέμη, που έχει δείξει την υψηλότερη ευαισθησία για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν KPC (Bratu S, 2005) έχει προταθεί για τον αρχικό έλεγχο των στελεχών. Ωστόσο η ειδικότητα του ελέγχου αυτού μπορεί να μειωθεί λόγω αντοχής εξαιτίας άλλων μηχανισμών, όπως η παραγωγή μιας AmpC ή μιας ESBL μαζί με έλλειψη πορίνης (Woodford N, 2006).

### **Μικροβιολογικές δοκιμές με αναστολείς**

Η μέθοδος δισκίων με EDTA χρησιμοποιείται συχνά για τον έλεγχο στελεχών που παράγουν μεταλλο-β-λακταμάση (Arakawa Y, 2000.), (Yong D, 2002.). Στη δοκιμή αυτή, η ζώνη αναστολής γύρω από ένα δισκίο β-λακτάμης αλλάζει από τη δράση του αναστολέα στην μεταλλο-β-λακταμάση του οργανισμού υπό εξέταση. Για τη δοκιμή αυτή έχουν χρησιμοποιηθεί ιμιπενέμη, κεφταζιδίμη και κεφεπίμη. Σε μια μελέτη, που σύγκρινε διαφορετικούς συνδυασμούς αντιβιοτικών και αναστολέων, ο συνδυασμός ιμιπενέμης-EDTA ήταν ο πιο ευαίσθητος για την ανίχνευση μεταλλο-β-λακταμάσης σε *Pseudomonas* και *A. baumannii*, ενώ ο συνδυασμός κεφταζιδίμης-κλαβουλανικού με EDTA ήταν ο πιο ακριβής για τις *K. pneumoniae*, και ο συνδυασμός κεφεπίμης-κλαβουλανικού με EDTA ήταν ο πιο ακριβής για τα *E. cloacae* και *C. freundii*, με μια συνολική ευαισθησία για τη μέθοδο αυτή 86.7 % (Yan JJ, 2004).

Επίσης, ταινίες E-test ειδικές για τις μεταλλο-β-λακταμάσες είναι διαθέσιμες ως ιμιπενέμη και συνδυασμός ιμιπενέμης με EDTA. Ένα θετικό αποτέλεσμα για μεταλλο-β-λακταμάση ερμηνεύεται ως τριπλή ή μεγαλύτερη μείωση στη MIC για την ιμιπενέμη παρουσία EDTA. Ο έλεγχος με Etest έδειξε μια ευαισθησία 94% και μια ειδικότητα 95% όταν εξετάστηκε ένα σύνολο 138 χαρακτηρισμένων στελεχών που παρήγαγαν μεταλλο-β-λακταμάση (Walsh TR, 2002).

Οι δοκιμές αδρανοποίησης καρβαπενεμών μπορεί να είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος για τον αρχικό χαρακτηρισμό στελεχών ανθεκτικών στις καρβαπενέμες (Hornstein M, 1997).

Μια άλλη μέθοδος είναι το τροποποιημένο Hodge τεστ όπου η αύξηση στην ανάπτυξη ενός στελέχους δείκτη γύρω από ένα δισκίο ιμιπενέμης δείχνει ένα θετικό αποτέλεσμα. Ένα πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι ένζυμα που έχουν πολύ ασθενή δραστηριότητα καρβαπενεμάσης μπορούν να ανιχνευτούν με τη μέθοδο αυτή.

### **Βιοχημικά και μοριακά τεστ**

Η ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το φορτίο τους, και η ανίχνευση της β-λακταμάσης ολοκληρώνεται με τη χρωμογόνο κεφαλοσπορίνη νιτροσεφίνη (Matthew M, 1975). Επικάλυψη της πηκτής με EDTA, κλαβουλανικό οξύ ή αζτρεονάμη μπορεί να ανιχνεύσει την ευαισθησία των ενζύμων σ' αυτούς τους πιθανούς αναστολείς, υποδεικνύοντας β-λακταμάσες τάξης B, A, ή C αντίστοιχα. Παρόλο που η IEF δεν μπορεί να προσδιορίσει μια συγκεκριμένη β-λακταμάση, μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για το ισοηλεκτρικό σημείο και χαρακτηριστικά αναστολής. Η IEF είναι πολύτιμη για την ανίχνευση πολλαπλών β-λακταμασών σε ένα στέλεχος.

Όταν υπάρχει η υποψία για την παρουσία μιας καρβαπενεμάσης, η PCR είναι ο ταχύτερος τρόπος για να προσδιοριστεί ποια οικογένεια β-λακταμάσης υπάρχει. Επίσης, τεχνικές υβριδισμού, όπως το Southern blot, έχουν χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί ο εντοπισμός του γονιδίου καρβαπενεμάσης σε χρωμόσωμα ή σε πλασμίδιο (Lolans K, 2006).

Τελικά, ο προσδιορισμός ενός γονιδίου β-λακταμάσης απαιτεί και την αλληλούχιση ολόκληρης της κωδικοποιούσας περιοχής. Ο χαρακτηρισμός μιας καινούργιας β-λακταμάσης ολοκληρώνεται όταν έχει πραγματοποιηθεί και η αλληλούχιση και η λειτουργική ανάλυση των προφύλ υδρόλυσης και αναστολής με την καθαρισμένη πρωτεΐνη.

### **4.4.4 Επιδημιολογία καρβαπενεμασών**

Ανησυχητική είναι η σταδιακή εξάπλωση των καρβαπενεμασών, που είναι βιοχημικά διαφορετικές και συμπεριλαμβάνουν μέλη των τριών από τις τέσσερις κλάσεις β-λακταμασών (A,B,D).

Τα KPC ένζυμα είναι σήμερα οι επικρατέστερες καρβαπενεμάσες στα Εντεροβακτηριακά (Nordmann P, 2009). Εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στη Βόρεια Καρολίνα (ΗΠΑ) το 1997, με επιδημίες στ Νέα Υόρκη το 2005. Από το 2006 τα KPC-θετικά στελέχη *K. pneumoniae* έχουν εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο: τις ΗΠΑ, το Ισραήλ, την Ελλάδα, και τελευταίως την Ιταλία, με αυξανόμενες εστίες στην Κίνα, τη Βραζιλία και αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες. Το υψηλότερο εθνικό ποσοστό επιπολασμού (έως 40 %) είναι για *K. pneumoniae* από βακτηριαιμία στην Ελλάδα (Giakkouri P, 2011).

Μεγάλο μέρος αυτής της διασποράς αντανακλά μια σχέση των KPC ενζύμων με τον επιτυχημένο κλώνο *K. pneumoniae* ST-258 (Woodford N, 2011). Μέλη του κλώνου αυτού είναι τυπικά ανθεκτικά σε όλα τα αντιβιοτικά εκτός της κολιστίνης, της τιγκεκυκλίνης, και της γενταμικίνης. Μια ανθεκτική στην κολιστίνη παραλλαγή του ST-258 κυκλοφορεί στην Ελλάδα (Kontopoulou K, 2010), με περιστατικά εντοπισμένα, πιθανώς μέσω εισαγωγής, στην Ουγγαρία και το Ηνωμένο Βασίλειο (Toth A, 2010). Επιπλέον τα KPC ένζυμα έχουν εξαπλωθεί σημαντικά μέσω πλασμιδίων ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη *K. pneumoniae* και άλλα Εντεροβακτηριακά, κυρίως *E. coli* και *Enterobacter spp.*

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (κλάση B) είναι από βιοχημικής άποψης πολύ διαφορετικές από τις KPC, και συμπεριλαμβάνουν τα VIM, IMP και NDM (New Delhi Metallo-) ένζυμα, μαζί με λιγότερο συχνές οικογένειες. Η VIM είναι η πιο σημαντική μεταλλο-β-λακταμάση. Για πρώτη φορά εντοπίστηκε σε *P. aeruginosa* στη Βερόνα (Ιταλία) το 1997 (Laurettil L, 1999) και στη συνέχεια εξαπλώθηκε στα Εντεροβακτηριακά, κυρίως *K. pneumoniae*. Από το 2005, ήταν παρούσα στην Ελλάδα σε 40% των *K. pneumoniae* που απομονώνονται από αίμα, απ' όπου στη συνέχεια έχει, εν μέρει, εκτοπιστεί από τα KPCένζυμα (Vatopoulos A, 2008). Στελέχη *K. pneumoniae* που φέρουν VIM καρβαπενεμάσες αναφέρονται όλο και περισσότερο παγκοσμίως, παρόλο που είναι λιγότερες σε αριθμό σε σχέση με τα στελέχη που φέρουν KPC ένζυμα. Οι VIM καρβαπενεμάσες δεν σχετίζονται με κάποιο ιδιαίτερο κλώνο όπως οι KPC καρβαπενεμάσες. Παρόλο που συμβαίνουν τοπικές επιδημίες, το μεγαλύτερο πρόβλημα είναι η διάδοση του *bla<sub>VIM</sub>* γονιδίου, κυρίως από πλασμίδια IncN (Vatopoulos A, 2008), (Garcia-Fernandez A, 2011).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# 1. Υλικά και μέθοδοι

## 1.1 Βακτηριακά Στελέχη

Η αρχική συλλογή των βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκαν περιελάμβανε 1500 στελέχη τα οποία προήλθαν από τα παρακάτω ελληνικά νοσοκομεία: Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, Γενικό Νοσοκομείο Σερρών, Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά «Τζάνειο», Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «ΑΧΕΠΑ», Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, κατά τη διάρκεια χρονικής περιόδου Ιανουάριο 2007 έως Δεκέμβριο 2011. Τα στελέχη τα οποία διερευνήθηκαν πλήρως και παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή περιλαμβάνουν: 375 στελέχη Εντεροβακτηριακών, 202 στελέχη θετικά για ESBP και αρνητικά για AmpC β-λακταμάση και καρβαπενεμάση τα οποία προήλθαν από ξεχωριστούς ασθενείς (150 στελέχη *E. coli*, 43 στελέχη *K. pneumoniae* και 9 στελέχη *E. Cloacae*); 58 στελέχη *K. pneumoniae* θετικά για KPC; 106 στελέχη αρνητικά για KPC (89 στελέχη *K. pneumoniae* και 17 στελέχη *E. coli*); 1 στέλεχος *K. pneumoniae* VIM-θετικό και ένα στέλεχος *K. pneumoniae* θετικό για KPC, VIM, CMY, CTX-M. Τα στελέχη αυτά προέρχονταν κυρίως από δείγματα ούρων και αίματος όπως και από τραύματα, βρογχικές εκκρίσεις και κατακλύσεις. Στη μελέτη αυτή, επίσης, χρησιμοποιήθηκαν σαν στελέχη ελέγχου τα πρότυπα στελέχη: *E. coli* ATCC 25922 (ένας οργανισμός που δεν παράγει ESBP), *K. pneumoniae* ATCC700603 (ένας οργανισμός που παράγει ESBP), *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Μετά τη συλλογή τα βακτηριακά στελέχη αποθηκεύτηκαν στους -80 °C σε ζωμό brain-heart infusion με 15% glycerol.

## 1.2 Καλλιέργεια και Απομόνωση

Η απομόνωση των στελεχών έγινε στα κοινά στερεά θρεπτικά υλικά, όπως: MacConkey άγαρ, αιματούχο άγαρ και Mueller Hinton άγαρ μετά από επώαση σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 ώρες.

### 1.3 Μικροβιακή ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των στελεχών στηρίχθηκε στη μορφολογία των αποικιών, στη χρώση κατά Gram και στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) χρησιμοποιώντας την κάρτα GN και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, ο έλεγχος ευαισθησίας σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες των στελεχών έγινε αρχικά με το σύστημα αυτό και χρησιμοποιήθηκε ως screening test. Τα στελέχη που παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία ( $MIC > 1 \mu\text{g/ml}$ ) στην κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφτριαξόνη και/ή αζτρεονάμη, όπως και αυτά που είχαν MIC στην ερταπενέμη 2-4  $\mu\text{g/ml}$ , στη μεροπενέμη 2-8  $\mu\text{g/ml}$  και στην ιμιπενέμη 2-8  $\mu\text{g/ml}$  υποβλήθηκαν σε περαιτέρω έλεγχο.

### 1.4. Μελέτη διασποράς των ESBLs στην Ελληνική επικράτεια και επίδρασης των νέων ερμηνευτικών κριτηρίων του CLSI στον έλεγχο ρουτίνας στελεχών που παράγουν ESBL

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 202 στελέχη ESBL αρνητικά για πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες και καρβαπενεμάσες που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της περιόδου 2007-2011 (150 στελέχη *E. coli*, 43 στελέχη *K. pneumoniae* και 9 στελέχη *E. Cloacae*).

#### 1.4.1 Έλεγχος επιβεβαίωσης φαινοτύπου ESBL σύμφωνα με τις οδηγίες του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI)

Έπειτα από τον αρχικό προσδιορισμό των MICs των στελεχών με το σύστημα VITEK 2, οι ύποπτοι για την παραγωγή ESBLs οργανισμοί ελέγχθηκαν με τη μέθοδο συνδυασμένων δισκίων με κλαβουλανικό οξύ για την επιβεβαίωση του φαινοτύπου ESBL. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στη σύγκριση της ζώνης αναστολής γύρω από ένα δίσκο κεφαλοσπορίνης και της ζώνης αναστολής γύρω από το δισκίο της ίδιας κεφαλοσπορίνης συνδυασμένης με κλαβουλανικό οξύ. Έτσι, σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI, χρησιμοποιήθηκαν δισκία κεφοταξίμης (30 $\mu\text{g}$ ) και κεφταζιδίμης (30 $\mu\text{g}$ )

χωρίς και σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ (10μg). Η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε Mueller-Hinton άγαρ χρησιμοποιώντας ενοφθάλμισμα 0.5 McFarland ( $\sim 1.5 \times 10^8$  CFU/ml) και ακολούθησε επώαση στους 37° C για 18 ώρες. Μια διαφορά  $\geq 5$  mm μεταξύ των διαμέτρων στις ζώνες αναστολής γύρω από τα δισκία κεφαλοσπορίνης με και χωρίς κλαβουλανικό οξύ είναι ενδεικτική του φαινοτύπου ESBL. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν η *E. coli* ATCC 25922 (ένας οργανισμός που δεν παράγει ESBL) ως αρνητικός μάρτυρας και η *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ένας οργανισμός που παράγει ESBL) ως θετικός μάρτυρας.

#### **1.4.2 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Προσδιορισμός της MIC με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ**

Στα στελέχη που ήταν θετικά για την παραγωγή ESBL προσδιορίστηκε η MIC για τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (ESCs): την κεφοταξίμη, την κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *E. coli* ATCC 25922 και *K. pneumoniae* ATCC 700603. Έτσι, μετά την παρασκευή του μητρικού διαλύματος του αντιβιοτικού με προτυποποιημένη καθαρή σκόνη αντιβιοτικού παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις τρυβλία με άγαρ MuellerHinton (Biolife) που περιείχαν υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού από 0.25 έως 512 μg/ml. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 και 512 μg/ml. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν, αντίστοιχα, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της MIC με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2. Η ετοιμασία του ενοφθαλμίσματος των στελεχών έγινε με την εναιώρηση αποικιών, από πρόσφατη καλλιέργεια 24 ωρών σε MH άγαρ, σε φυσιολογικό ορό έως ότου επιτευχθεί πυκνότητα ισοδύναμη με 0.5 της πρότυπης κλίμακας McFarland η οποία αντιστοιχεί σε  $\sim 1.5 \times 10^8$  cfu/ml. Στα τρυβλία ενοφθαλμίστηκαν 10 μl ( $10^4$  cfu/spot) από εναιώρημα που περιείχε περίπου  $10^6$  cfu/ml με τη βοήθεια ειδικού διανεμητή (Denley Instruments, Sussex, UK) που μεταφέρει το μικροβιακό εναιώρημα. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επέτρεπε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθόρισε την MIC στα αντίστοιχα αντιβιοτικά.

Τα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά με βάση τα αναθεωρημένα ερμηνευτικά κριτήρια του CLSI, 2010. Το όριο ευαισθησίας για τα Εντεροβακτηριακά είναι για την κεφοταξίμη  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , για την κεφταζιδίμη  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  και για την κεφεπίμη  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$ .

### 1.4.3 Εξαγωγή του μικροβιακού DNA

Ακολούθησε η απομόνωση βακτηριακού DNA από τα στελέχη της μελέτης. Μεμονωμένες αποικίες από ανακαλλιέργεια που έγιναν σε Mueller Hinton άγαρ για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του γενετικού υλικού, η οποία έγινε με την χρήση του εμπορικού kit της Qiagen που ονομάζεται Qiaamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Δύο έως τρεις μεμονωμένες αποικίες εναιωρούνται σε 180  $\mu\text{l}$  λυτικού διαλύματος (ATL Buffer) με ανάδευση για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K, γίνεται ανάδευση και επώαση στους 56 °C για 2 ώρες με ενδιάμεση ανάδευση έτσι ώστε στο διάστημα αυτό επιτυγχάνεται η λύση. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 200  $\mu\text{l}$  λυτικού διαλύματος (AL Buffer) για να αποδεσμευτούν οι πρωτεΐνες. Σημαντική είναι η ομογενοποίηση του μείγματος με ανάδευση. Ακολουθεί επώαση στους 70 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 200  $\mu\text{l}$  απόλυτης αιθανόλης και ακολουθεί ανάδευση για 15 λεπτά. Το ομογενοποιημένο νέο δείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη εκχύλισης (QIAamp Spin column), η οποία έχει τοποθετηθεί σε ένα σωληνάριο των 2 ml. Η στήλη φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 8000 rpm. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και προστίθεται διάλυμα πλύσεως (AW1 και AW2, 500  $\mu\text{l}$  έκαστο) και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 8000 rpm και 3 στις 13000 rpm αντίστοιχα. Με μία επιπλέον φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 14000 rpm απομακρύνονται τα υπολείμματα των διαλυμάτων έκπλυσης. Στο τέλος της διαδικασίας στη στήλη προστίθενται 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος εκχύλισης (AE Buffer). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 8000 rpm και μεταφορά σε σωληνάρια τύπου eppendorf και συντήρηση στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους.

#### 1.4.4 Ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμασών με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Τα υπό μελέτη στελέχη ελέγχθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις ESBLs: CTX-M, SHV, TEM, GES/IBC, για τα γονίδια καρβαπενεμασών VIM, KPC, IMP, NDM και OXA-48, όπως και για τα πλασμιδιακά AmpC γονίδια. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA των βακτηρίων και ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3, 4, 5).

**Πίνακας 3.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη για την ενίσχυση γονιδίων ESBL.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' - 3')	Μέγεθος PCR προϊόντων (bp)	Συνθήκες PCR
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M-F	GGTTAAAAAATCACTGCG	873	94°C 45sec
	CTX-M-R	TTACAAACCGTCGGA		54°C 45sec 72°C 1min
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV A	ACTGAATGAGGCGCTTCC	220	94°C 1min
	SHV B	CGCACCCCGCTTGCT		54°C 1min 72°C 1min
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-F	GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCGCT	1014	94°C 45sec
	SHV-R	TCTTTCCGATGCCGCCGCGCCAGTCA		54°C 1min 72°C 1min
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM A	TCAGAAGTAAGTTGGC	355	94°C 1min
	TEM S	CCTGTTTTTGCTCACCC		54°C 1min 72°C 1min
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-F	TTCTTGAAGACGAAAGGGC	1208	94°C 45sec
	TEM-R	ACGCTCAGTGGAACGAAAAC		54°C 45sec 72°C 1min
<i>bla</i> <sub>IBC</sub>	IBC-F	CCCCAAGGAGAGATCGTCG	618	95°C 45sec
	IBC-R	GTAATCTCTCTCCTGGGCTT		53°C 45sec 72°C 60sec

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση γονιδίων καρβαπενεμασών.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μέγεθος PCR προϊόντων (bp)	Συνθήκες PCR
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIMN-F	ATGGTGTTTGGTCGCATATC	509	95°C 45sec
	VIMN-R	TGGGCCATTTCAGCCAGATC		53°C 45sec 72°C 60sec
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM1-F	TTATGGAGCAGCAACGATGT	920	95°C 45sec
	VIM1-R	CAAAAGTCCCCTCCAACGA		53°C 45sec 72°C 60sec
<i>bla<sub>IPM</sub></i>	IMP--F	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG	587	95°C 60sec
	IMP-R	AACCAGTTTTGCCTTACCAT		55°C 60sec 72°C 90sec
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPC A	GTAATCTCTCTCCTGGGCTT	780	95°C 45sec
	KPC B	TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC		53°C 45sec 72°C 60sec
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPC-F	GCTACACCTAGCTCCACCTTC	989	95°C 45sec
	KPC-R	GCATGGATTACCAACCACTGT		53°C 45sec 72°C 60sec
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA-48A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	725	95°C 45sec
	OXA-48B	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		54°C 45sec 72°C 60sec
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621	95°C 45sec
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		54°C 45sec 72°C 60sec

**Πίνακας 5.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση γονιδίων πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μέγεθος PCR προϊόντων (bp)	Συνθήκες PCR
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 έως CMY-11	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	94°C30 sec,
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		64 °C30 sec, 72 °C60 sec
LAT-1 - LAT-4, CMY-2 έως CMY-7, BIL-1	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	94°C30 sec,
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		64 °C30 sec, 72 °C60 sec
DHA-1, DHA-2	DHAMF	AAC TTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	94°C30 sec,
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		64 °C30 sec, 72 °C60 sec
ACC	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	94°C30 sec,
	ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		64 °C30 sec, 72 °C60 sec
MIR-1T ACT-1	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	94°C30 sec,
	EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		64 °C30 sec, 72 °C60 sec
FOX-1 έως FOX-5b	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	94°C30 sec,
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		64 °C30 sec, 72 °C60 sec

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (Platinum® Pfx DNA Polymerase, Invitrogen. Inc, Carsbad, CA, USA) ώστε να αποφευχθεί η εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων κατά την ενίσχυση του γονιδίου. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X κατάλληλο για την δράση της DNA πολυμεράσης το οποίο περιείχε περίπου 100ng γενωμικού DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο dNTP, 0.4μM από κάθε εκκινητή, 5U DNA πολυμεράσης, σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή Mini Cycloer της MJ Research στις συνθήκες που αναφέρονται στους Πίνακες 3, 4, 5. Όλες οι αντιδράσεις

πραγματοποιήθηκαν σε 35 κύκλους με αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 λεπτά και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά.

#### 1.4.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης

Οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. 10μL από το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,8% χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Επίσης, προστέθηκαν 15μL διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου, EtBr (από αρχικό stock 10mg/ml), σε 150ml αγαρόζη. Το EtBr προστίθεται έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των τμημάτων DNA στην πηκτή αγαρόζης και αυτό οφείλεται στην ιδιότητά του να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φωσφορίζει κάτω από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120-130V για 1 ώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Στην συνέχεια, μεταφέρθηκαν 10μL από το προϊόν της PCR, που είχαν προηγουμένως αναμιχθεί με 2μL χρωστική 6x (6x Loading Dye Solution, Fermentas), σε μία από τις θέσεις υποδοχής της πηκτής. Η χρωστική που χρησιμοποιείται βοηθάει το DNA να καθίσει στην βάση της υποδοχής και επίσης μας επιτρέπει να παρακολουθούμε την ηλεκτροφόρηση. Παράλληλα με το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler 100bp DNA Ladder, 0.1μg/μl, Fermentas) ο οποίος περιέχει τμήματα DNA γνωστού μεγέθους.

#### 1.4.6 Καθαρισμός των προϊόντων PCR και αλληλούχιση

Στα PCR προϊόντα που υποβλήθηκαν στη διαδικασία ανεύρεσης αλληλουχίας βάσεων εφαρμόστηκε καθαρισμός με το σύστημα του εμπορικού kit Purelink® PCR Purification Kit (Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA) για την απομάκρυνση αλάτων, εκκινητών, dNTPs και άλλων μη νουκλεϊκών αντιδραστηρίων. Εφαρμόστηκε το προτεινόμενο από τον κατασκευαστή πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα:

Σε 40 μl προϊόντος PCR προστέθηκαν 160 μl ρυθμιστικού διαλύματος καθαρισμού PureLink Binding Buffer με ισοπροπανόλη και ακολούθησε ανάδευση ελαφρά μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε μία στήλη PureLink Spin Column και ακολούθησε φυγοκέντρησή της στα 10.000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να προσδεθεί το δίκλωνο DNA στη στήλη. Απορρίφθηκε το υγρό που είχε εισρεύσει από τη στήλη και προστέθηκαν στη στήλη 650 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεως Wash Buffer με αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρωση



της στήλης στα 10.000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίφθηκε το υγρό που έχει εισρεύσει από τη στήλη. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα για 2-3 λεπτά για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Η στήλη Τοποθετήθηκε σε ένα σωληνάριο eppendorf του 1.5ml. Προστέθηκαν στο κέντρο της στήλης 50 µl διαλύματος έκλουσης Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα έκλουσης με το καθαρό PCR προϊόν που αποθηκεύτηκε στους -20 °C για περαιτέρω χρήση.

Η μέθοδος της ανεύρεσης αλληλουχίας βάσεων εφαρμόστηκε για τον ακριβή εντοπισμό τυχόν μεταλλάξεων. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με μηχάνημα αλληλούχισης ABIPrism 377 DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των προϊόντων της PCR έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου Sanger. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση σεσημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) με τέσσερις διαφορετικές χρωστικές μία για κάθε βάση και στερούνται της 3-OH ομάδας, με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία και να εμποδίζουν την προσθήκη άλλων νουκλεοτιδίων. Έτσι προκύπτουν αλληλουχίες DNA με ποικίλο μήκος που αντιστοιχούν σε διαφορετικές θέσεις ενσωμάτωσης των ddNTPs και ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η αρχική φάση γίνεται όπως και η PCR σε θερμοκυκλοποιητή, με τη διαφορά ότι στην ανάλυση αλληλουχίας των βάσεων χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που οδηγεί σε γραμμικό πολλαπλασιασμό των προϊόντων επέκτασης. Για κάθε δείγμα γίνονται 4 ξεχωριστές αντιδράσεις σε αντίστοιχα σωληνάρια που το καθένα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την *in vitro* σύνθεση του DNA, τα σεσημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP ή ddCTP ή ddGTP ή ddTTP) και έναν εκκινητή. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται 4 σεσημασμένα DNA θραύσματα διαφορετικού μήκους. Για την τελική ανίχνευση των θραυσμάτων του γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ανάλυση του ηλεκτροφορήματος και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των βάσεων γίνεται με αυτόματο αναλυτή (DNA sequencer). Οι αλληλουχίες βάσεων που ανευρέθηκαν συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στην Τράπεζα Γονιδιακών Πληροφοριών, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Genbank που διατίθεται από το NCBI, National Center for Biological Information.

## 1.5 Ανίχνευση της KPC καρβαπενεμάσης με τη νέα μέθοδο δίσκων βορονικού οξέος

Το στέλεχος *K. pneumoniae* M410 ταυτοποιήθηκε με το σύστημα VITEK2. Επίσης, ο αρχικός έλεγχος ευαισθησίας έγινε με το σύστημα αυτό. Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανοντας και τις καρβαπενέμες. Το στέλεχος ήταν ευαίσθητο στις αμινογλυκοσίδες, τη τιγκεκυκλίνη και την κολιστίνη, αλλά ανθεκτικό στην κοτριμοξαζόλη και τις φθοριοκινολόνες.

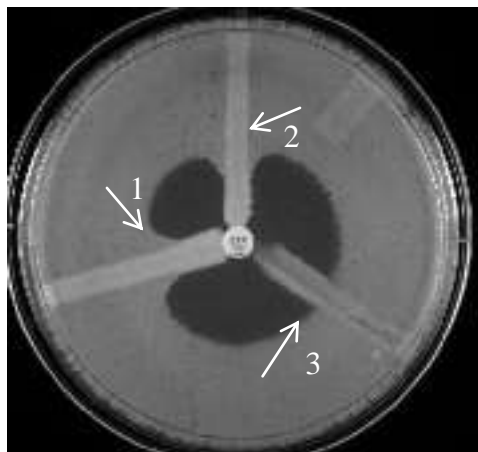
### 1.5.1 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Έγινε ο προσδιορισμός της MIC του στελέχους με τη μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ σύμφωνα με τις οδηγίες και τα ερμηνευτικά κριτήρια του CLSI, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα κριτήρια του CLSI 2006. Για την τιγκεκυκλίνη χρησιμοποιήθηκαν οι συστάσεις της Αμερικανικής Υπηρεσίας τροφίμων και Φαρμάκων (ευαίσθητο  $\leq 2$  mg/L; ανθεκτικό  $\geq 8$  mg/L) και για την κολιστίνη χρησιμοποιήθηκαν οι συστάσεις του CLSI για τα *Acinetobacter* spp. (ευαίσθητο  $\leq 2$  mg/L; ανθεκτικό  $\geq 4$  mg/L).

### 1.5.2 Φαινοτυπικός έλεγχος για την παρουσία καρβαπενεμάσης

Η παρουσία καρβαπενεμάσης ελέγχθηκε αρχικά με το τροποποιημένο τεστ Hodge (MHT) χρησιμοποιώντας την *E. coli* ATCC 25922 ως στέλεχος δείκτη και δισκία ιμιπενέμης 10 mg. Ετοιμάστηκε εναιώρημα 0.5 McFarland της *E. coli* ATCC 25922 σε φυσιολογικό ορό, και στη συνέχεια αραιώθηκε 1:10 με φυσιολογικό ορό. Ενοφθαλμίστηκε το αραιωμένο εναιώρημα σε τρυβλίο MH. Το τρυβλίο αφέθηκε να στεγνώσει για 3 – 10 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκε το δισκίο ιμιπενέμης. Χρησιμοποιώντας κρίκο λήφθηκαν 3 – 5 αποικίες από το στέλεχος προς εξέταση, που προηγουμένως αναπτύχθηκε σε αιματούχο άγαρ, και ενοφθαλμίστηκαν σε μία ευθεία γραμμή πάνω στο έξω άκρο του δισκίου. Η γραμμή θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20 – 25 χλ. σε μήκος. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης, ένας αρνητικός και ένας θετικός μάρτυρας. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 20 ώρες. Μετά την επώαση

εξετάστηκε το τρυβλίο για ενισχυμένη ανάπτυξη γύρω από την γραμμή του εξεταζόμενου οργανισμού και του μάρτυρα στο σημείο τομής της γραμμής και της ζώνης αναστολής. Όταν παρατηρείται ενισχυμένη ανάπτυξη το τεστ θεωρείται θετικό για παραγωγή καρβαπενεμάσης (**Εικόνα 16**).



**Εικόνα 16.** ΜΗΤ. 1- στέλεχος υπό έλεγχο, 2-θετικός μάρτυρας, 3-αρνητικός μάρτυρας

### 1.5.3 Φαινοτυπικός έλεγχος για την παρουσία μεταλλο-β- λακταμάσης (MBL)

Ο έλεγχος για την παρουσία της μεταλλο-β-λακταμάσης έγινε με MBL Etest και με τη δοκιμή συνδυασμένου δίσκου ιμιπενέμη με EDTA. Τα MBL Etest είναι ταινίες δύο όψεων που περιέχουν βαθμίδωση σκέτης ιμιπενέμης στη μία άκρη τους και σε συνδυασμό με EDTA στην άλλη άκρη. Σε τρυβλία Mueller-Hinton ενοφθαλμίστηκε βακτηριακό εναιώρημα 0.5 McFarland και στη συνέχεια τοποθετήθηκε η ταινία MBLE-test. Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C. Το τεστ θεωρείται θετικό όταν υπάρχει τριπλάσια ή και μεγαλύτερη μείωση της MIC της ιμιπενέμης παρουσία του EDTA. Στην περίπτωση της δοκιμής του συνδυασμένου δίσκου χρησιμοποιήθηκαν δισκία ιμιπενέμης μόνη της και σε συνδυασμό με EDTA. Το test πραγματοποιήθηκε πάνω σε τρυβλία Mueller-Hinton όπου ενοφθαλμίστηκε βακτηριακό εναιώρημα 0.5 McFarland και στη συνέχεια έγινε η τοποθέτηση των δισκίων. Μετά από επώαση 24 ωρών έγινε σύγκριση των ζωνών αναστολής γύρω από το δισκίο ιμιπενέμης και το δισκίο ιμιπενέμης με EDTA. Στην περίπτωση παρουσίας της μεταλλο-β-λακταμάσης η ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο της ιμιπενέμης με

το EDTA μεγαλώνει. λόγω της ανασταλτικής δράσης του EDTA στη μεταλλο-β-λακταμάση. Μια διαφορά  $\geq 5$  χιλ. στις διαμέτρους ζωνών αναστολής γύρω από τα δισκία ιμιπενέμης και ιμιπενέμης με EDTA είναι ενδεικτική του θετικού αποτελέσματος.

#### 1.5.4 Φαινοτυπικός έλεγχος με τη νέα μέθοδο δισκίων βορονικού οξέος

Πραγματοποιήθηκαν τεστ με δισκία βορονικού οξέος για εξετάσουμε την ικανότητα του τεστ να ανιχνεύσει την παραγωγή του KPC ενζύμου. Τα δισκία με το βορονικό οξύ ετοιμάστηκαν ως εξής: 120 mg φαινύλβορονικού οξέος διαλύθηκαν σε 3 ml διμέθυλο σουλφοξείδιο. 3 ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού προστέθηκε στο προηγούμενο διάλυμα. 20  $\mu$ L του διαλύματος στοκ μοιράστηκε στα δισκία με το αντιβιοτικό και μετά αφέθηκαν να στεγνώσουν για 30 λεπτά και χρησιμοποιήθηκαν αμέσως. Το test πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμίζοντας Mueller Hinton άγαρ σύμφωνα με την τυποποιημένη μέθοδο διάχυσης και τοποθετώντας στο άγαρ δισκία που περιείχαν διάφορες β-λακτάμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη, κεφεπίμη, κεφοξιτίνη, κεφοτετάνη, κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη και αζτρεονάμη) με και χωρίς 400  $\mu$ g βορονικού οξέος. Το τεστ θεωρείται θετικό όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από το δισκίο που περιείχε το αντιβιοτικό μαζί με το βορονικό οξύ είναι  $\geq 5$  χιλ. από τη διάμετρο της ζώνης αναστολής γύρω από το δισκίο του αντιβιοτικού χωρίς το βορονικό οξύ.

#### 1.5.5 Ενίσχυση γονιδίων β-λακταμασών με την μέθοδο της PCR

Τα γονίδια β-λακταμασών ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας ένα πάνελ από εκκινητές για τη ανίχνευση των γονιδίων ESBL: CTX-M, SHV, TEM, GES/IBC, MBL γονιδίων (VIM, IMP, NDM), των γονιδίων *bla*<sub>KPC</sub> και γονιδίων πλασμιδιακών AmpCs. Οι εκκινητές αναφέρονται στους Πίνακες 3, 4, 5 και η PCR εκτελέστηκε με τον τρόπο που αναφέρθηκε στην ενότητα 1.4.4. Έγινε ο καθαρισμός των προϊόντων PCR και ακολούθησε η αλληλούχισή του.

## 1.6 Αξιολόγηση της νέας μεθόδου βορονικού οξέος

Για την αξιολόγηση της μεθόδου βορονικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν 57 γονοτυπικά επιβεβαιωμένα στελέχη με KPC. Η παρουσία του γονιδίου *bla<sub>KPC</sub>* προσδιορίστηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που αναφέρονται στους Πίνακες 3, 4, 5. Επίσης, πραγματοποιήθηκε RT-PCR (PCR αντίστροφης μεταγραφής) για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου του KPC ενζύμου.

Για την αξιολόγηση της ειδικότητας της μεθόδου εξετάστηκαν 89 στελέχη *K. pneumoniae* με αρνητική PCR για KPC. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν τυχαία ανάμεσα σε στελέχη που είχαν μειωμένη ευαισθησία είτε στην κεφοξιτίνη (MIC > 8 µg/ml), είτε στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (κεφοταξίμη ή κεφταζιδίμη; MIC > 8 µg/ml), είτε στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη ή μεροπενέμη; MIC > 4 µg/ml). Επιπλέον, εξετάστηκαν και 17 KPC-αρνητικά στελέχη *E. coli* με τα ίδια χαρακτηριστικά. Τα 106 στελέχη διαθέτane μία ποικιλία πλασμιδιακών AmpC, ESBL και MBL γονιδίων.

Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με το σύστημα VITEK2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

### 1.6.1 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη), τις πενικιλίνες (αμπικιλίνη, πιπερακιλλίνη), τους συνδυασμούς β-λακταμών-αναστολέων (αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ, πιπερακιλλίνη-ταζοβακτάμη), την κεφοξιτίνη, τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (κεφταξιδίμη, κεφοταξίμη, κεφεπίμη), την αζτρεονάμη, τη σιπροφλοξασίνη, τη τριμεθοπρίμη, την αμικασίνη, την κολιστίνη, την γενταμικίνη και τη τιγκεκυκλίνη, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ σύμφωνα με τις οδηγίες και τα ερμηνευτικά κριτήρια του CLSI 2007. Για την τιγκεκυκλίνη χρησιμοποιήθηκαν οι συστάσεις της Αμερικανικής Υπηρεσίας τροφίμων και Φαρμάκων (ευαίσθητο  $\leq 2$  mg/L; ανθεκτικό  $\geq 8$  mg/L) και για την κολιστίνη χρησιμοποιήθηκαν οι συστάσεις του CLSI για τα *Acinetobacter spp.* (ευαίσθητο  $\leq 2$  mg/L; ανθεκτικό  $\geq 4$  mg/L).

### 1.6.2 Μοριακός έλεγχος των γονιδίων αντοχής με PCR

Τα γονίδια β-λακταμασών ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας ένα πάνελ από εκκινητές για τη ανίχνευση των MBL γονιδίων (VIM, IMP, NDM), των γονιδίων KPC, γονιδίων πλασμιδιακών AmpC και των ESBL γονιδίων (SHV, TEM, CTX-M). Οι εκκινητές αναφέρονται στον **Πίνακα 3** και η PCR εκτελέστηκε με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Έγινε ο καθαρισμός των προϊόντων PCR και ακολούθησε η αλληλούχισή τους. Ως θετικοί μάρτυρες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν στελέχη που είχαν τους συγκεκριμένους τύπους β-λακταμασών. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν και πραγματοποιήθηκε αλληλούχισή τους (Macrogen, Σεούλ, Νότια Κορέα).

### 1.6.3 Φαινοτυπικός έλεγχος με τα δισκία βορονικού οξέος

Πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος και των 153 στελεχών με το τεστ δισκίων βορονικού οξέος. Η μέθοδος εκτελέστηκε με τον τρόπο που έχει περιγραφεί παραπάνω. Χρησιμοποιήθηκαν δισκία που περιείχαν 8 διαφορετικές β-λακτάμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη, κεφεπίμη, κεφοξιτίνη, κεφοτετάνη, κεφοταξίμη και κεφταζιδίμη) με ή χωρίς βορονικό οξύ στο άγαρ. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C ολονυχτίως. Το τεστ θεωρήθηκε θετικό όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από το δισκίο που περιείχε το αντιβιοτικό μαζί με το βορονικό οξύ ήταν  $\geq 5$  χλ. από τη διάμετρο της ζώνης γύρω από το δισκίο του αντιβιοτικού χωρίς το βορονικό οξύ.

### 1.6.4 Προσδιορισμός ευαισθησίας, ειδικότητας θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας του τεστ βορονικού οξέος

Η απόδοση του τεστ δισκίων βορονικού οξέος για την ανίχνευση των KPC ενζύμων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την PCR ως πρότυπη μέθοδο. Για κάθε τεστ υπολογίστηκε η ευαισθησία από τον αριθμό των KPC στελεχών που προσδιορίστηκαν σωστά, ενώ η ειδικότητα υπολογίστηκε από τον αριθμό των αρνητικών για KPC στελεχών που προσδιορίστηκαν σωστά.

Ο υπολογισμός των παραμέτρων αξιολόγησης της μεθόδου έγιναν σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους (**Πίνακας 6**):

**Πίνακας 6.** Τύποι για τον υπολογισμό παραμέτρων αξιολόγησης της μεθόδου βορονικού οξέος

Ευαισθησία (sensitivity)	TP	X 100
	TP + FN	
Ειδικότητα (specificity)	TN	X 100
	TN + FP	
Θετική Προγνωστική Αξία (Positive Predictive Value)	TP	X 100
	TP + FP	
Αρνητική Προγνωστική Αξία (Negative Predictive Value)	TN	X 100
	TN + FN	

TP = TruePositive → Αληθώς Θετικό Αποτέλεσμα

FP = FalsePositive → Ψευδώς Θετικό Αποτέλεσμα

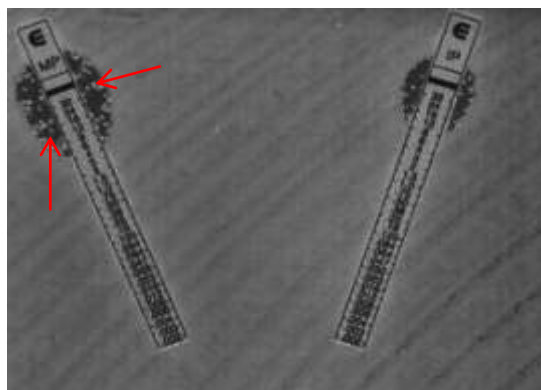
TN = TrueNegative → Αληθώς Αρνητικό Αποτέλεσμα

FN = FalseNegative → Ψευδώς Αρνητικό Αποτέλεσμα

## 1.7 Χαρακτηριστικά της ετερογενούς αντοχής στη μεροπενέμη σε στελέχη *K. pneumoniae* θετικά για KPC καρβαπενεμάση

### 1.7.1 Βακτηριακά στελέχη και έλεγχοι ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν έξι στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-2 και επιλέχθηκαν τυχαία από την συλλογή μας ανάμεσα σ' εκείνα που ήταν ευαίσθητα στην μεροπενέμη με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI κατά το 2008-2009 που απομονώθηκαν ( $MICs \leq 4 \mu g/ml$ ) όμως, παρουσίαζαν διάσπαρτες ετερογενείς αποικίες στην ζώνη αναστολής (Εικόνα 17).



**Εικόνα 17.** Παρουσία ετερογενών αποικιών στην ζώνη αναστολής.

Τα στελέχη ανακτήθηκαν από ξεχωριστούς ασθενείς σε τρία νοσοκομεία εντοπισμένα σε διαφορετικές ελληνικές περιοχές. Οι *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. Aeruginosa* ATCC 27853 και ένα κλινικό στέλεχος *K. pneumoniae* ευαίσθητο στη μεροπενέμη και αρνητικό για καρβαπενεμάση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Οι MICs για καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη), τις πενικιλίνες (αμπικιλίνη, πιπερακιλλίνη), τους συνδυασμούς β-λακταμών-αναστολέων (αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ, πιπερακιλλίνη-ταζοβακτάμη), την κεφοξιτίνη, τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (κεφταζιδίμη, κεφοταξίμη, κεφεπίμη), την αζτρεονάμη, τη σιπροφλοξασίνη, τη τριμεθοπρίμη, την αμικασίνη, την κολιστίνη, την γενταμικίνη και τη τιγεκυκλίνη προσδιορίστηκαν με E-test και με τη μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ.

### 1.7.2 Πληθυσμιακή ανάλυση και έλεγχος σταθερότητας της ετερογένειας

Η πληθυσμιακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε απλώνοντας περίπου  $10^8$  CFU σε τρυβλία Mueller-Hinton που περιείχαν μεροπενέμη σε διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις για συγκεντρώσεις από 256 έως 0.25  $\mu\text{g/ml}$  και επωάζοντάς τα για 48 ώρες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν για όλα τα στελέχη και η μέση τιμή των αποικιών (CFUs) για κάθε συγκέντρωση αποτυπώθηκε σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα. Η συχνότητα των ετερογενών πληθυσμών στην υψηλότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού υπολογίστηκε διαιρώντας τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο που περιείχε αντιβιοτικό με τον αριθμό αποικιών από το ίδιο βακτηριακό ελαιώρημα που απλώθηκε σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό. Η σταθερότητα των MICs μεροπενέμης για τρεις διαφορετικές αποικίες που αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση



αντιβιοτικού προσδιορίστηκε με τη μέθοδο αραίωσης σε άγαρ μετά από 7 μέρες ανακαλλιεργειών σε μέσο χωρίς αντιβιοτικό.

### 1.7.3 Ποσοτική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *bla<sub>KPC</sub>* με τη PCR αντίστροφης τρανσκριπτάσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR)

Η ποσοτική αντίδραση PCR αντίστροφης τρανσκριπτάσης σε πραγματικό χρόνο για την έκφραση του *bla<sub>KPC-2</sub>* εφαρμόστηκε για τις μητρικές (native) και τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις μεροπενέμης οι οποίες συλλέχτηκαν είτε αμέσως από τα τρυβλία είτε μετά από μια εβδομάδα ανακαλλιεργειών σε υλικό χωρίς αντιβιοτικό.

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με το κιτ της Invitrogen SuperScript<sup>TM</sup> III Platinum® SYBR® GreenOne-Step qRT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ζευγάρια εκκινητών:

Γονίδιο στόχος (*bla<sub>KPC</sub>*)

KPC 98: 5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3'

KPC 334: 5'-CGTCATGCCTGTTGTCAG-3'

Γονίδιο αναφοράς (16SrRNA)

*Ribofor*: 5'-GAAGAAGCACCGGCTAACTC-3'

*Riborv*: 5'-CACATCCGACTTGACAGACC-3'

Η ποσοτική PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Mx3005P (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Το γονίδιο 16SrRNA χρησιμοποιήθηκε για την προτυποποίηση της μεθόδου. Οι συνθήκες της PCR ήταν: ένας κύκλος στους 50°C για 3 min, ένας κύκλος στους 95°C για 5 min, 40 κύκλοι: από 95°C για 15 sec, 60°C για 30 sec και ένας κύκλος στους 40°C για 1 min. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA απομονωμένο από τα υπό μελέτη στελέχη. Η εξαγωγή του ολικού RNA έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο TRIReagent (Ambion, Derbyshire, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με φασματοφωτομετρία στα 260 nm. Οι ενδεχόμενες επιμολύνσεις από γενωμικό DNA απομακρύνθηκαν με τη δράση της DNaseI (Fermentas). Για κάθε στέλεχος οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν. Η έκφραση γονιδίου στους ετερογενείς υποπληθυσμούς εκφράστηκε ως πολλαπλάσιο της αύξησης σχετικά με την έκφραση των μητρικών πληθυσμών που ορίστηκαν ως βαθμονομητές (calibrator). Ο έλεγχος για επιμολύνσεις από DNA έγινε συμπεριλαμβάνοντας αντιδράσεις ελέγχου μη-αντίστροφης μεταγραφής

χρησιμοποιώντας στις αντιδράσεις αυτές απλή TaqPolymerase αντί για αντίστροφη τρανσκριπτάση.

#### 1.7.4 Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Bactericidal Assays)

Για την εκτέλεση των μικροβιοκτόνων δοκιμασιών χρησιμοποιήθηκαν μεροπενέμη, γενταμικίνη και συνδυασμός των δύο αντιβιοτικών. Υγρές καλλιέργειες μικροβίων σε Mueller-Hinton ζωμό που βρίσκονταν στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία εναιωρήματος σε cation-adjusted Mueller-Hinton ζωμό, και περίπου  $5 \times 10^6$  CFUs ενοφθαλμίστηκαν σε Mueller-Hinton ζωμό που περιείχετα αντιβιοτικά σε συγκέντρωση ίση με αυτή των MICstους. Δείγματα των 50  $\mu$ l αφαιρέθηκαν από την υγρή καλλιέργεια μετά από 0, 1, 3, 6, 9, 12 και 24 ώρες για την μέτρηση των ζώντων βακτηρίων διανέμοντας διαδοχικές αραιώσεις σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ χωρίς αντιβιοτικό και επωάζοντάς τα για 24 ώρες. Η διαδικασία αυτή εκτελέστηκε εις τριπλούν για όλα τα στελέχη, και η μέση τιμή των ζώντων CFUs υπολογίστηκε για κάθε χρόνο και αποτυπώθηκε σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα για κάθε στέλεχος. Η βακτηριοκτόνος δράση (99.9 % θανάτωση) ορίστηκε ως μείωση  $\geq 3 \log_{10}$  CFUs/ml των ζώντων κυττάρων σε σχέση με το αρχικό εναιώρημα.

### 1.8 Ανίχνευση νέας μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-19 σε στέλεχος *K. pneumoniae* που παρήγαγε συγχρόνως τις β-λακταμάσες KPC-2, CMY-2 και CTX-M-15

#### 1.8.1 Βακτηριακά στελέχη και φαινοτυπικοί έλεγχοι

Το στέλεχος *K. pneumoniae* KP1935 ανακτήθηκε το Μάιο του 2008 από λοίμωξη ουροποιητικού συστήματος μιας 64-χρονης ασθενούς. Οι MICs για αρκετές β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες, σιπροφλοξασίνη, τριμεθοπρίμη, τετρακυκλίνη, τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ. Το στέλεχος ελέγχθηκε φαινοτυπικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης με τη μέθοδο συνδυασμού δίσκων χρησιμοποιώντας τέσσερα δισκία μεροπενέμης, ένα χωρίς και τα άλλα τρία με EDTA, φαινυλβορονικό οξύ (PBA) και μαζί EDTA και PBA. Ως μάρτυρες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν η *K. pneumoniae* ATCC 13883, η *P. aeruginosa*

ATCC 27853 και στελέχη από τη συλλογή μας που παρήγαγαν ένζυμα KPC, VIM και ESBLs.

### 1.8.2 Έλεγχος γονιδίων αντοχής με PCR

Ανίχνευση των γονιδίων KPC, πλασμιδιακών AmpC, OXA-48 καρβαπενεμάσης, MBLs και ESBLs (TEM-, SHV- και CTX-M-τύπου) έγινε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που αναφέρονται στους **Πίνακες 3, 4, 5**. Στελέχη Θετικά για τα συγκεκριμένα γονίδια χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στην αντίδραση της PCR. Έγινε επίσης, έλεγχος με PCR για την χαρτογράφηση ιντεγκρονίου συνδυάζοντας ειδικούς εκκινητές για την συντηρημένη περιοχή 5' – CS και 3' – CS με εκκινητές για τα γονίδια *bla<sub>VIM</sub>*, *aacA*, *dfr*, *aadA*, *qacED* και *sul*:

INT-5'CS: 5'-CTTCTAGAAAACCGAGGATGC-3'

INT-3'CS: 5'-CTCTCTAGATTTTAATGCGGA-3'

VIM-N F: 5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3'

VIM-N R: 5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3'

AACA7-F: 5'-ACTAGGGTTTGCCGAGCTTT-3'

AACA7-R: 5'-TGCGCTGTTGGTAAGTTGAG-3'

DHFRI-F: 5'-ATGGAGTGCCAAAGGTGAAC-3'

DHFRI -R: 5'-TATCTCCCCACCACCTGAAA-3'

AADAI-F: 5'-TGATTTGCTGGTTACGGTGA-3'

DHFRI-R: 5'-AGTTCGCGCTTAGCTGGATA-3'

SUL-F: 5'-AGGCTGGTGGTTATGCACTC-3'

SUL-R: 5'-CCGACTTCAGCTTTTGAAGG-3'

## 1.9 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12

### 1.9.1 Κλωνοποίηση γονιδίου της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12

#### *Σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου VIM-12*

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν έτσι ώστε ο νοηματικός εκκινητής να έχει στο 5' άκρο του την αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο Nde

I, και ο αντιστοίχιστος εκκινητής να έχει στο 5' άκρο του την αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BamH I.

Forward εκκινητής

NdeI

**GCATATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGG**

Reverse εκκινητής

BamHI

**GGATCCCTACTCAACGACTGAG**

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε η Platinum® Pfx DNA Polymerase, Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA η οποία προστέθηκε στην αντίδραση μετά την αρχική αποδιάταξη. Για τα 10 τελευταία λεπτά της επιμήκυνσης χρησιμοποιήθηκε η απλή Taq πολυμεράση ώστε να δημιουργηθούν οι 3' Α προεξοχές.

Η αντίδραση έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την δράση της DNA πολυμεράσης, σε τελικό όγκο 50μl, στο οποίο προστέθηκαν περίπου 50ng γενωμικού DNA, 0.2 mM από κάθε dNTP, 0.4μM από κάθε εκκινητή, 5 U DNA πολυμεράσης. Η αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή Mini Cyclor της MJ Research στις συνθήκες : αρχική αποδιάταξη για 1 λεπτό στους 98°C; 32 κύκλοι αποδιάταξης στους 95 °C για 45 δευτερόλεπτα , υβριδισμού στους 50 °C για 1 λεπτό; επιμήκυνσης στους 72 °C για 1,5 λεπτό; τελική επιμήκυνση για 10 λεπτά στους 72 °C.

### ***Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αгарόζης***

40μL από το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,2% χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X ( 1LTAE 50X: 242 grTrisbase, 57.1 ml οξικόοξύ, 100ml EDTA 0.5M pH 8απιονισμένο νερό έως το 1 L). Επίσης, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (7μL EtBr 1% σε 100ml αгарόζης).

### ***Εκχύλιση τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης***

Μετά την ηλεκτροφόρηση η μπάντα του DNA που αντιστοιχούσε στο μέγεθος του προϊόντος που περιμέναμε αφαιρέθηκε με προσοχή από το υπόλοιπο κομμάτι της πηκτής και εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας το Hi Yield Gel PCR DNA fragments (Real Genomics). Η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit.

**Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation)**

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε παρουσία προϊόντος PCR, που εκχυλίστηκε, όπως παραπάνω, και του πλασμιδιακού φορέα pGem-Teasy Vector (Promega), σε αναλογία 3:1 σύμφωνα με τον **Πίνακα 7**. Η ποσότητα του προϊόντος PCR (insert) που χρησιμοποιήθηκε υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

(ng vector x kb of insert/kb of vector) x insert: vector molar ration

(25ng x 0.8 kb/3 kb) x 3/1 = 20 ng προϊόντος PCR.

Το μείγμα επωάστηκε ολονυχτίως στους 4°C.

**Πίνακας 7.** Αντίδραση Λιγάσης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µL
pGem –Teasy Vector (50ng/µL)	0.5 µL
Προϊόν PCR 10.5 ng/Μl	2 µL
T4 DNA Ligase 3Weiss Units/µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	1.5 µL

**Μετασχηματισμός χημικά επιδεκτικών κυττάρων DH5α**

200 ml LB άγαρ (3 γρ. σκόνη LB άγαρ, 1 γρ. NaCl, 100 ml απιονισμένο H<sub>2</sub>O) αποστειρώθηκαν και μοιράστηκαν σε τρυβλία αφού προστέθηκε αμικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100µg/ml. Ξεπαγώθηκαν σε πάγο τα επιδεκτικά κύτταρα DH5α (Invitrogen) και προστέθηκαν 10 µL από την αντίδραση λιγάσης (46ng) σε 100 µL επιδεκτικά κύτταρα. Ακολούθησε επώαση 30 λεπτών σε πάγο. Στη συνέχεια, το μείγμα τοποθετήθηκε στους 42°C για 1.5 λεπτό έτσι ώστε να προκληθεί “heat shock” στα κύτταρα και αμέσως μετά 2 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 900µL θρεπτικού μέσου SOC (100ml SOC pH 7: 2 γρ. Tryptone, 0.5 γρ. εκχύλισμα *S. Cerevisiae*, 1 ml NaCl 1M, 0.25 ml KCl 1M, 1 ml Διάλυμα Mg<sup>2+</sup> 2M, 1ml γλυκόζη 2M, απιονισμένο H<sub>2</sub>O έως τα 100 ml) και επώαση για 2 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση 160 rpm.

Τα τρυβλία με LB άγαρ επιστρώνονται με 16µL X-gal και 100µL IPTG 100mM και αφήνονται να στεγνώσουν. Στην συνέχεια, επιστρώνονται 300 µL κύτταρα και επωάζονται O/N στους 37°C.

***Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα***

Οι μεγαλύτερες λευκές αποικίες, που αναπτύχθηκαν, ενοφθαλμίστηκαν σε 5 ml LB ζωμό, που περιείχε αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και επώσθηκαν O/N στους 37°C, υπό ανάδευση, στα 210 rpm. Τρία ml της O/N καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το kit NucleoSpin Plasmid Quick Pure (MACHEREY-NAGEL). 5 μL πλασμιδιακού DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1%.

***Ανάλυση πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού***

Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε επώσθηκε με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI (New England Biolabs). Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε η παρουσία του επιθυμητού τμήματος DNA, στην συγκεκριμένη περίπτωση του γονιδίου VIM-12, στον πλασμιδιακό φορέα pGem-T Easy Vector.

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και διασπούν το φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ των βάσεων. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20μL, χρησιμοποιώντας 5U BamHI, 10U NdeI και 200ng πλασμιδιακού DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X του ενζύμου BamHI. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει επίσης BSA το οποίο δεσμεύεται στα τοιχώματα του σωλήνα, εμποδίζοντας τα ένζυμα να δεσμεύονται σ'αυτά και να μειώνεται η δραστηριότητά τους. Το μίγμα της αντίδρασης επώσθηκε για 2.5 ώρες στους 37°C. Στο τέλος της επώασης τα 20 μL ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,5% και η μπάντα που αντιστοιχούσε στο μέγεθος του γονιδίου VIM-12 εκχυλίστηκε από την πηκτή.

***Σύνδεση του γονιδίου VIM 12 με τον πλασμιδιακό φορέα pET-15b***

Επώσθηκε το τμήμα DNA, το οποίο έχει στα δύο άκρα τις προεξοχές που έχουν δημιουργηθεί από τα ένζυμα περιορισμού, με το γραμμικό φορέα pET-15b (Novagen), το οποίο είχε κοπεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού, σε αναλογία 3:1. Η σύνδεση πραγματοποιήθηκε από την T4 DNA λιγάση. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε τελικό όγκο 10μL σε ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης και παρουσία ATP 5mM.

***Μετασχηματισμός κυττάρων BL21***

Τα κύτταρα BL21 (Novagen) χρησιμοποιούνται για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο όπως και για το μετασχηματισμό των κυττάρων DH5α. Στο LB άγαρ προστέθηκε αμπικιλίνη και

χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν 56ng DNA για 100μL κύτταρα BL21.

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ενοφθαλμίστηκαν σε 5 ml ζωμό LB που περιείχαν αμικικιλίνη και χλωραμφαινικόλη στις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι καλλιέργειες αυτές ελέγχθηκαν με PCR για την παρουσία του γονιδίου VIM-12.

### ***Υπερέκφραση της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης***

Για την υπερέκφραση της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης ετοιμάστηκαν 2 L από ζωμό LB στα οποία προστέθηκαν αμικικιλίνη και χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 100μL/ml. 5ml O/N καλλιέργειας κυττάρων BL21, που είχαν το γονίδιο της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης, ενοφθαλμίστηκαν σε 100 ml ζωμού LB και επώαστηκαν στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm) έως ότου η OD<sub>600</sub> (η απορρόφηση στα 600nm) να έφτασε 0,4, τιμή που αντιστοιχεί στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Στην συνέχεια τα 100ml καλλιέργειας ενοφθαλμίστηκαν στα 2 L ζωμού LB και επώαστηκαν πάλι στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι που η OD<sub>600</sub> να έφτασε 0,4. Στο σημείο αυτό προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5mM έτσι ώστε να επάγεται η έκφραση της μεταλλο-β-λακταμάσης και η καλλιέργεια επώαστηκε για 5 ώρες επιπλέον, στους 30°C υπό ανάδευση (210 rpm). Στη συνέχεια, οι καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στα 4000 x g για 20 λεπτά στους 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -80°C.

### **1.9.2 Καθαρισμός της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης**

Η κλωνοποίηση του γονιδίου VIM-12 στο φορέα pET-15b, με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πρωτεΐνης η οποία έχει στο αμινο-τελικό της άκρο ένα εξαπεπτίδιο από ιστιδίνες. Εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα αυτή, ο καθαρισμός της πρωτεΐνης γίνεται με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας ρητίνη αгарόζης Ni-NTA.

### ***Ομογενοποίηση των κυττάρων***

Το ίζημα κυττάρων από τα 2 L καλλιέργειας αναδιαλύεται καλά σε 10 ml διάλυμα ομογενοποίησης (ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM, NaCl 500mM, Triton 0,1%, B-mercaptoethanol 5mM, ZnSO<sub>4</sub> 1mM, Lysozyme 10μg/ml, PMSF 1mM, Glycerol 5%)

Ακολούθησε η διαδικασία θραύσης των κυττάρων με υπέρηχους, η οποία πραγματοποιείται μέσα σε πάγο. Στη συνέχεια το ελαιώδες φυγοκεντρήθηκε στα 14000 x g για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό σωληνάριο και φυγοκεντρήθηκε σε υπερφυγόκεντρο στα 100000 x g για 1 ώρα. Μετά την υπερφυγοκέντρωση το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ξανά σε ένα καθαρό σωληνάριο έτοιμο για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης. Πραγματοποιήθηκε επίσης μία μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.

### ***Καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας κάτω από φυσικές συνθήκες***

Για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ρητίνη αραρόζης Ni-NTA, η οποία συσκευάστηκε σε στήλη, σε μία σύριγγα των 10 ml στη βάση της οποίας τοποθετήθηκε υαλοβάμβακας. Χρησιμοποιήθηκε περίπου 1 ml διάλυμα ρητίνης 50% για 5 mg ολικής πρωτεΐνης. Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 5 ml. Μετά τη συσκευασία η στήλη σταθεροποιήθηκε περνώντας τουλάχιστον 5 όγκους στήλης ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης (binding buffer: ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM, NaCl 500mM, β-mercaptoethanol 5mM, ZnSO<sub>4</sub> 1mM, PMSF 1mM, glycerol 5%). Στη συνέχεια, προστέθηκε το υπερκείμενο. Η πρωτεΐνη μας δεσμεύεται πάνω στη στήλη λόγω της μεγάλης συγγένειας που έχουν οι έξι ιστιδίνες για τα ιόντα νικελίου, ενώ οι άλλες πρωτεΐνες διαπερνάνε τη στήλη. Η συγγένεια των ιστιδινών για τα ιόντα νικελίου οφείλεται στο δακτύλιο του ιμιδαζολίου που διαθέτουν. Ωστόσο, μία μικρή ποσότητα μη ειδικών συνδεδεμένων πρωτεϊνών παραμένει πάνω στη στήλη. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών αυτών περνάμε από τη στήλη το διάλυμα έκπλυσης (washing buffer: ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM, NaCl 500mM, β-mercaptoethanol 5mM, ZnSO<sub>4</sub> 1mM, PMSF 1mM, glycerol 5%, imidazol 20mM). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου που περιέχει το διάλυμα έκπλυσης βοηθάνε στον πιο αποτελεσματικό καθαρισμό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου οι έξι ιστιδίνες εξασφαλίζουν μία επαρκή δέσμευση της πρωτεΐνης πάνω στη στήλη, ενώ οι μη ειδικά δεσμευμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται. Η στήλη διαπεράστηκε με τουλάχιστον 5 όγκους στήλης διάλυμα έκπλυσης, στη συγκεκριμένη περίπτωση 25ml. Στη συνέχεια, ακολούθησε η έκλυση της πρωτεΐνης με 25 ml διάλυμα έκπλυσης (ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM, NaCl 500mM, imidazol 500mM). Το διάλυμα αυτό περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου το οποίο ανταγωνίζεται τις ιστιδίνες για τη δέσμευση στα ιόντα νικελίου με αποτέλεσμα η



επιθυμητή πρωτεΐνη να αποδεσμεύεται από τη στήλη και να εκλούεται. Η συλλογή του εκλούσματος έγινε σε κλάσματα των 1.5 ml. Ακολούθησε έλεγχος των κλασμάτων για την παρουσία της πρωτεΐνης, σε πρώτη φάση, μετρώντας την απορρόφηση στα 260nm όπου απορροφάνε οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα κλάσματα που απορροφούσαν ελέγχθηκαν για δραστηριότητα β-λακταμάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την νιτροσεφίνη, ένα β-λακταμικό αντιβιοτικό το οποίο αλλάζει χρώμα και γίνεται κόκκινο όταν υδρολύεται. Τέλος, τα κλάσματα που έδειξαν να έχουν δραστηριότητα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης.

### ***Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες***

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel) 12%, και την πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel) 5%. Η πηκτή συγκέντρωσης έχει μικρότερη πυκνότητα από τη πηκτή διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που φορτώνονται έτσι ώστε όταν φτάσουν στην πηκτή διαχωρισμού να βρίσκονται σε μία ευθεία γραμμή. Αρχικά, στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται η πηκτή διαχωρισμού (4ml μείγμα ακρυλαμίδιου 30%, 2.5ml TrisHCl 1.5M pH 8.8, 0.1ml SDS 10%, 0.004ml TEMED, 0.1ml APS 10%, 3.3ml απιονισμένο H<sub>2</sub>O). Ευθυγραμμίστηκε η επιφάνειά της με την προσθήκη μικρής ποσότητας ισοπροπανόλης, η οποία απομακρύνθηκε όταν έπηξε η πηκτή. Στη συνέχεια, πάνω από αυτή, τοποθετήθηκε η πηκτή συγκέντρωσης 12% (0.83ml μείγμα ακρυλαμίδιου 30%, 0.63ml Tris HCl 1 M pH 6.8, 0.05ml SDS 10%, 0.005ml TEMED, 0.05ml APS, 3.4ml απιονισμένο H<sub>2</sub>O).

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (0.8ml Tris 0.625M pH 6.8, 0.8ml Glycerol, 0.4ml β-mercaptoethanol, 1.6ml SDS, 0.4ml bromophenolblue 1%, 4ml H<sub>2</sub>O) σε μία αναλογία 15μl δείγματος / 5μl ρυθμιστικού διαλύματος και στην συνέχεια την μετουσίωση των πρωτεϊνών με θέρμανση στους 70<sup>0</sup>C για 2 λεπτά.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος και όχι το φορτίο τους, καθώς αυτό είναι ενιαίο λόγω του SDS. Τα δείγματα φορτώθηκαν στις υποδοχές της πηκτής παράλληλα με ένα μάρτυρα μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση

έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris, γλυκίνη, SDS 1X (72 γρ. γλυκίνη, 15 γρ Tris-HCl και 5 γρ SDS διαλύονται σε 500ml dH<sub>2</sub>O).

Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης αφαιρέθηκε η πηκτή συγκέντρωσης και βάφτηκε η πηκτή διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (stain solution: 0.1 gr Coomassie Brilliant Blue, 80 ml μεθανόλη, 20 ml οξικό οξύ, 100 ml dH<sub>2</sub>O) για 45 λεπτά.

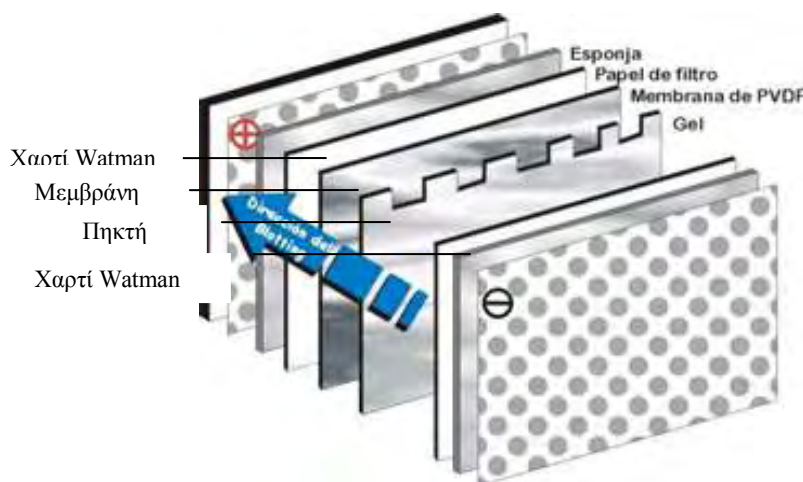
Ακολούθησε αποχρωματισμός της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution: 150 ml μεθανόλη, 50 ml οξικό οξύ, 300 ml dH<sub>2</sub>O) σε τρεις πλύσεις.

Στο τέλος της διαδικασίας οι ζώνες των πρωτεϊνών είναι ευδιάκριτες λόγω της μπλε χρωστικής Coomassie Brilliant Blue.

### ***Ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με την τεχνική ανοσοαποτύπωσης (Western blotting)***

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται επειδή υπάρχουν τα κατάλληλα αντισώματα στα οποία μπορούν να δεσμεύονται οι πρωτεΐνες. Σύμφωνα με τη τεχνική αυτή, οι πρωτεΐνες, μετά την ηλεκτροφόρηση, μεταφέρθηκαν σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έτσι ώστε να είναι εύκολα προσβάσιμες από τα αντισώματα. Τοποθετήθηκε χαρτί Whatman, εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1X (transfer buffer 10X: 4.5 γρ. Tris, 2.5 γρ. βορικό οξύ, 6 ml SDS 10% pH 8.5, απιονισμένο H<sub>2</sub>O έως τα 300 ml) ως κάτω στρώση στη συσκευή. Πάνω από αυτό τοποθετήθηκε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, εμποτισμένη και αυτή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετήθηκε η πηκτή και στο τέλος άλλο ένα χαρτί Whatman εμποτισμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (**Εικόνα 18**). Η τοποθέτηση έγινε με προσοχή για να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες οι οποίες δεν επιτρέπουν τη διέλευση του ρεύματος. Οι πρωτεΐνες στην πηκτή έχουν αρνητικό φορτίο λόγω του SDS. Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό δυναμικό μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης οι πρωτεΐνες αρχίζουν να κινούνται από την πηκτή προς τη μεμβράνη και εγκλωβίζονται στο πλέγμα της. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η μεταφορά έγινε στα 50 mA για 45 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησαν τα παρακάτω βήματα: 1) η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε 15ml διάλυμα γάλακτος 5% σε PBS για 45 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά το στάδιο αυτό καλύπτεται η μεμβράνη με τις πρωτεΐνες του γάλακτος, ώστε να αποκλεισθεί η μη ειδική δέσμευση του αντισώματος στην επιφάνεια της μεμβράνης; 2) το γάλα απορρίφθηκε και προστέθηκαν άλλα 15ml τα οποία περιείχαν ποντικίσιο αντίσωμα (Biocompare) έναντι του εξαιρεπτιδίου των

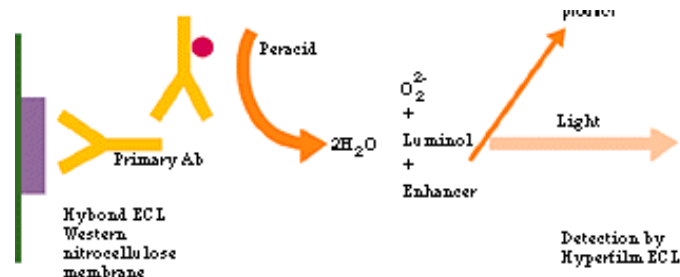
ιστιδινών, αραιωμένο 1:3000. Η μεμβράνη επώσθηκε με το αντίσωμα για 15 λεπτά και ύστερα αφέθηκε ολονύχτια στους 4°C (εναλλακτικά αναδεύεται για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου);



**Εικόνα 18.** Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

3) στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο ξεπλύματα των 5 λεπτών με διάλυμα PBS-Tween (100 ml PBS + 500μL Tween); 4) ακολούθησε η προσθήκη του δεύτερου κατσκευασμένου αντισώματος (Anogen), έναντι ποντικίστων αντισωμάτων, αραιωμένο 1:3000 με διάλυμα γάλακτος 2% σε PBS-Tween και επώση για 1 ώρα υπό ανάδευση. Το δεύτερο αντίσωμα έχει ενσωματωμένο πάνω την υπεροξειδάση του  $H_2O_2$ ; 5) ακολούθησαν 3 ξεπλύματα με PBS-Tween ανά 10 λεπτά; 6) απομακρύνθηκε το διάλυμα PBS-Tween και επώσθηκε η μεμβράνη για 1min με το μίγμα: 10 ml λουμινόλη, 100 μl κουμαρικό οξύ, 30 μl 3%  $H_2O_2$ .

Η υπεροξειδάση του  $H_2O_2$ , που υπάρχει στο δεύτερο αντίσωμα, καταλύει την αντίδραση οξείδωσης της λουμινόλης. Η οξειδωμένη λουμινόλη εκπέμπει φως το οποίο αποτυπώθηκε σε CL Xposure φιλμ (**Εικόνα 19**). Έγιναν εμφανίσεις σε διαφορετικούς χρόνους έτσι ώστε ανάλογα με την ένταση του σήματος να έχουμε το καλύτερο αποτέλεσμα.



Εικόνα 19. Ανίχνευση σήματος στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την αντίδραση της λουμινόλης.

### 1.9.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12

*Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου: pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση δισθενών μεταλλικών ιόντων και άλατος*

Το κλάσμα με το καθαρό ένζυμο συλλέχθηκε και ακολούθησε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM για 24 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Στην συνέχεια, το ένζυμο φυλάχθηκε στους -20 °C σε 20% γλυκερόλη.

Για τον προσδιορισμό βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου έγιναν πειράματα υδρόλυσης σε τιμές pH: 6, 6.7, 7, 7.2, 7.6 και 8.2; στις θερμοκρασίες: 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C και 50°C; σε συγκέντρωση ιόντων  $Zn^{2+}$ : 0, 50, 100, 150, 200, 300 και 500μM; ιόντων  $Mg^{2+}$  και  $Mn^{2+}$ : 50 και 100μM; και συγκεντρώσεις KCl: 0, 1, 10, 25, 50 και 100mM. Ως ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας χρησιμοποιήθηκε Hepes 50mM και, ως υπόστρωμα, το αντιβιοτικό νιτροσεφίνη 47.5 μM για την επίδραση του pH και της θερμοκρασίας και πενικιλίνη 500μM για την επίδραση μεταλλικών ιόντων και άλατος. Όλα τα πειράματα έγιναν σε τελικό όγκο 1ml και μετρήθηκε η διαφορά απορρόφησης στο χρονικό διάστημα 1 λεπτό. Στη περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε νιτροσεφίνη μετρήθηκε η αύξηση της απορρόφησης στα 486nm, που αντιπροσωπεύει το σχηματισμό προϊόντος, ενώ για την πενικιλίνη μετρήθηκε η μείωση της απορρόφησης στα 235nm, το οποίο αντιπροσωπεύει την κατανάλωση του υποστρώματος. Η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε στο βέλτιστο pH και αυτή των μεταλλικών ιόντων και άλατος στο βέλτιστο pH και στη βέλτιστη θερμοκρασία.

### Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της VIM-12

Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα τα αντιβιοτικά: πενικιλίνη G, αζτρεονάμη, ιμιπενέμη και μεροπενέμη. Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενζύμου με την μέθοδο Bradford. Για κάθε αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις με έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις, αναλόγως, και μελετήθηκε η κατανάλωση του υποστρώματος (ως μείωση της απορρόφησης) σε σχέση με το χρόνο, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ενζύμου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50 mM, pH 6.7 και θερμοκρασία 40°C σε τελικό όγκο 1 ml. Για κάθε αντιβιοτικό κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης – απορρόφησης για να μπορεί να γίνει η αντιστοίχιση των τιμών απορροφήσεων σε συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Οι συγκεντρώσεις κάθε αντιβιοτικού που χρησιμοποιήθηκαν και τα ανάλογα μήκη κύματος που έγινε ο προσδιορισμός καταγράφονται στον **Πίνακα 8**:

**Πίνακας 8.** Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών και μήκη κύματος στα οποία μελετήθηκε η υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου.

Αντιβιοτικό	Συγκεντρώσεις (μM)						nm
Penicillin G	250	500	750	1000			235
Aztreonam	100	200	300	400			292
Imipenem	10	30	50	100			299
Meropenem	10	20	30	50	75	100	299

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και ένα πείραμα ελέγχου στο οποίο παρατηρήθηκε η υδρόλυση της πενικιλίνης 500μM χρησιμοποιώντας στη μία περίπτωση εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων BL21 μετά από επαγωγή με IPTG και στην άλλη περίπτωση χωρίς να έχει γίνει επαγωγή. Και στις δύο περιπτώσεις η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ίδια. Η αντίδραση έγινε στις βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας τελικό όγκο 1 ml.

Στη συνέχεια, για κάθε αντιβιοτικό κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προόδου της αντίδρασης τοποθετώντας στον άξονα ψ τις διαφορές απορρόφησης, που αντιπροσωπεύουν την κατανάλωση του υποστρώματος, και στον άξονα χ το χρόνο. Για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος υπολογίστηκε η αρχική ταχύτητα  $V_0$  από την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης και κατασκευάστηκε το διάγραμμα Michaelis-Menten ( $V_0$  σε συνάρτηση  $[S]$ ). Ακολούθησε ο υπολογισμός των κινητικών

παραμέτρων  $K_M$  και  $V_{max}$  με βάση την εξίσωση Michaelis Menten με την βοήθεια του στατιστικού πακέτου επεξεργασίας GraphPadPrism.

### ***Επίδραση συνδυασμού αντιβιοτικών στην δράση της VIM-12***

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναστολής του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα πενικιλίνη 500  $\mu M$  και ως αναστολείς τα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, επώαστηκε το ένζυμο για 10 λεπτά με συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200 και 500  $\mu M$  μεροπενέμης; 100, 200 και 500  $\mu M$  ιμιπενέμης; 100, 200, 500 και 1000  $\mu M$  αζτρεονάμης. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε η υδρόλυση της πενικιλίνης για 10 λεπτά, ως μείωση της απορρόφησης στα 235 nm. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ήταν η ίδια και σταθερή. Από τις μετρήσεις που έγιναν κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προόδου υδρόλυσης της πενικιλίνης απουσία αναστολέα και παρουσία κάθε αναστολέα για κάθε συγκέντρωσή του.

### ***Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής για κάθε αναστολέα***

Για τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις πενικιλίνης 100, 250, 500, 750 και 1000  $\mu M$ . Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων ήταν 10  $\mu M$  για την μεροπενέμη, 100  $\mu M$  για την ιμιπενέμη και 100  $\mu M$  για την αζτρεονάμη. Για κάθε αναστολέα κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προόδου της αντίδρασης για τις πέντε συγκεντρώσεις πενικιλίνης και από αυτές υπολογίστηκε η  $V_0$  από την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης. Κατασκευάστηκε το διάγραμμα Michaelis Menten απουσία και παρουσία κάθε αναστολέα ( $V_0$  σε συνάρτηση  $[S]$ ) και υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες κινητικές παράμετροι ( $K_M$ ,  $V_{max}$  και  $K_{Mi}$  και  $V_{maxi}$ ) με βάση την εξίσωση Michaelis Menten χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο επεξεργασίας GraphPadPrism. Κατασκευάστηκε επίσης, το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της υδρόλυσης της πενικιλίνης απουσία και παρουσία των αναστολέων. Για την μεροπενέμη και την αζτρεονάμη υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής.

## 2. Αποτελέσματα

### 2.1 Διασπορά των ESBLs στην Ελληνική επικράτεια. Επίδραση των νέων ερμηνευτικών κριτηρίων της CLSI στον έλεγχο ρουτίνας στελεχών που παράγουν ESBL

#### 2.1.1 Η κατανομή των γονιδίων ESBLs ανάμεσα στα κλινικά στελέχη υπό μελέτη

Κατά την διάρκεια της μελέτης μελετήθηκαν φαινοτυπικά και γονοτυπικά 202 κλινικά στελέχη *Εντεροβακτηριακών* που παρήγαγαν ESBLs και ήταν αρνητικά για πλασμιδιακού τύπου AmpC β-λακταμάση και καρβαπενεμάση. Ο αρχικός έλεγχος για ESBLs επιβεβαιώθηκε με τη φαινοτυπική μέθοδο συνδυασμού δισκίων CTX (30 μg) και CAZ (30μg) με και χωρίς προσθήκη κλαβουλανικού οξέος (10 μg) και με τη μοριακή μέθοδο της PCR που εφαρμόστηκε για την εντόπιση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ESBLs όπως: *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>GES/IBC</sub>. Στον Πίνακα 9 φαίνονται η κατανομή των ESBLs γονοτύπων και τα πρότυπα ευαισθησίας στις ESCs των στελεχών υπό μελέτη. Ο μοριακός έλεγχος έδειξε ότι ανάμεσα στα θετικά για ESBLs στελέχη, 157 (77.7%) έφεραν τον CTX-M-τύπο και 45 (22.3%) τον SHV-τύπο ESBL. Η ανάλυση της αλληλουχίας έδειξε ότι 91 (58%) από τα στελέχη που έφεραν CTX-M-τύπου ESBL είχαν το γονίδιο *bla*<sub>CTX-M-3</sub> και 66 (42%) είχαν το γονίδιο *bla*<sub>CTX-M-15</sub> που ανήκουν και τα δύο στην ομάδα CTX-M-1. Όλα τα στελέχη θετικά για SHV-τύπου ESBL βρέθηκαν να έχουν το γονίδιο *bla*<sub>SHV-5</sub>. Οι ESBLs τύπου TEM ή GES/IBC δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα από τα στελέχη.

#### 2.1.2. Η κατανομή των γονιδίων ESBLs ανάμεσα στα είδη *Εντεροβακτηριακών*

Ανάμεσα στα 150 *E.coli*, 136 (90.7%) ήταν θετικά για ESBLτύπου CTX-M και τα υπόλοιπα 14 (9.3 %) ήταν θετικά για την SHV-5ESBL. Από τα 136 *E. coli* CTX-M-τύπου, 89 (65.4 %) και 47 (36.6 %) έφεραν τα γονίδια *bla*<sub>CTX-M-3</sub> και *bla*<sub>CTX-M-15</sub> αντίστοιχα. Ανάμεσα στα 43 στελέχη *K. pneumoniae*, 21 (48.8 %) ήταν θετικά για CTX-M- τύπου ESBLs και τα υπόλοιπα 22 (51.2 %) ήταν θετικά για το SHV-5-τύπο.

Ανάμεσα στα 21 στελέχη που παράγανε CTX-M, το γονίδιο *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ήταν επικρατέστερο (19 στελέχη; 90.5 %), ενώ μόνο 2 στελέχη (9.5 %) έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. Όλα τα 9 στελέχη *E. cloacae* έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>SHV-5</sub> (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9.** Κατανομή των ESBLs γονοτύπων και τα πρότυπα ευαισθησίας στις ESCs των στελεχών υπό μελέτη

Bacterial strain/ESBL genotype (no. of isolates)	No. of isolates with the indicated susceptibility pattern	ESC susceptibility pattern		
		Cefotaxime	Ceftazidime	Cefepime
<i>Escherichia coli</i> (n = 150)				
CTX-M-1 group (136)				
CTX-M-3 (89)	42	R	S	S
	14	R	S	I
	16	R	S	R
	5	R	R	R
	4	S	S	S
	3	R	R	S
	2	R	R	I
	1	R	I	S
	1	R	I	I
	1	R	I	R
CTX-M-15 (47)	13	R	R	R
	10	R	R	S
	10	R	R	I
	7	R	S	S
	3	R	I	I
	2	R	S	I
	1	S	I	S
	1	R	I	S
SHV group (14)				
SHV-5 (14)	3	S	R	S
	3	I	R	S
	3	R	R	R
	2	S	S	S
	2	S	I	S
	1	R	R	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 43)				
CTX-M-1 group (21)				
CTX-M-3 (2)	1	S	R	S
	1	R	S	S
CTX-M-15 (19)	9	R	R	R
	7	R	R	S
	1	R	S	S
	1	R	S	I
	1	R	R	I
SHV group (22)				
SHV-5 (22)	14	R	R	S
	5	R	R	R
	2	R	R	I
	1	R	I	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (n = 9)				
SHV group				
SHV-5 (9)	8	R	R	S
	1	R	R	I

R, ανθεκτικό; S, ευαίσθητο; I, ενδιάμεσο



### 2.1.3 Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και τα επίπεδα ευαισθησίας ανάμεσα στα στελέχη *Εντεροβακτηριακών* που παρήγαγαν ESBLS

Οι τιμές MICs, MIC<sub>50</sub> και MIC<sub>90</sub> (MICs για το 50 % και το 90 % αντίστοιχα) των ESCs ενάντια στα στελέχη υπό μελέτη που παρήγαγαν ESBLS όπως και τα επίπεδα ευαισθησίας στις ESCs, εφαρμόζοντας τα καινούργια κριτήρια του CLSI που εφαρμόστηκαν το 2010, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 10**.

Ένα σύνολο 145 (71.8 %) στελεχών ήταν ευαίσθητα σε τουλάχιστον μία από τις εξεταζόμενες κεφαλοσπορίνες. Ειδικότερα, 13 (6.4 %), 90 (44.6 %) και 112 (55.4 %) στελέχη ήταν ευαίσθητα στην κεφοταξίμη, την κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη αντίστοιχα (**Πίνακας 10**). Από τα 43 στελέχη *K. pneumoniae*, 1 (2.3 %), 3 (7 %) και 25 (58.1 %) ήταν ευαίσθητα στην κεφοταξίμη, την κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη αντίστοιχα, ενώ από τα 150 στελέχη *E. coli*, 12 (8.0 %), 87 (58.0 %) και 79 (52.7 %) φάνηκαν ευαίσθητα στις παραπάνω ESCs. Ιδιαίτερα, ανάμεσα στα στελέχη *E. coli*, 16 στελέχη είχαν MIC για την κεφταζιδίμη  $\leq 0.25$  µg/ml και 25 στελέχη MIC 0.5 µg/ml. Επιπλέον, 4 και 3 από τα στελέχη *E. coli* παρουσίασαν πολύ χαμηλές MICs για την κεφεπίμη (0.25 µg/ml και 0.5 µg/ml αντίστοιχα, (**Πίνακας 10**). Από τα στελέχη *E. cloacae*, κανένα δεν βρέθηκε ευαίσθητο στην κεφοταξίμη και την κεφταζιδίμη, ενώ όλα εκτός από ένα ήταν ευαίσθητα στην κεφεπίμη (MICs 2 – 4 µg/ml), (**Πίνακας 10**).

**Πίνακας 10.** MICs, MIC<sub>50</sub> και MIC<sub>90</sub> των ESCs ενάντια στα στελέχη υπό μελέτη που παρήγαγαν ESBLS και τα επίπεδα ευαισθησίας στις ESCs

Isolates	ESC	No. of isolates with MIC (µg/mL) of:													MIC (µg/mL)		No. (%) of susceptible isolates
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>		
<i>Escherichia coli</i> (n= 150)	Cefotaxime	0	1	5	6	3	17	20	11	7	44	15	21	64	>256	12(8.0)	
	Ceftazidime	1	15	25	13	17	16	10	36	12	3	0	2	4	32	87(58.0)	
	Cefepime	0	4	3	4	2	21	45	33	20	17	0	1	8	64	79(52.7)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n= 43)	Cefotaxime	0	1	0	0	0	4	6	7	8	9	4	4	32	128	1(2.3)	
	Ceftazidime	0	0	1	0	2	0	1	8	7	12	4	8	64	>256	3(7.0)	
	Cefepime	1	0	0	1	0	6	17	4	7	3	2	2	8	64	25(58.1)	
<i>Enterobacter cloacae</i> (n= 9)	Cefotaxime	0	0	0	0	0	4	4	1	0	0	0	0	8	16	0	
	Ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	32	64	0	
	Cefepime	0	0	0	0	6	2	0	1	0	0	0	0	2	16	8(88.9)	
Total ESBL-isolates (n= 202)	Cefotaxime	0	2	5	6	3	25	30	19	15	53	19	25	32	>256	13(6.4)	
	Ceftazidime	1	15	26	13	19	16	11	47	22	18	4	10	8	64	90(44.6)	
	Cefepime	1	4	3	5	8	29	62	38	27	20	2	3	8	64	112(55.4)	

MIC<sub>50/90</sub>, οι MICs για το 50% και το 90% των στελεχών αντίστοιχα.

### 2.1.4 Τα προφίλ ευαισθησίας ανάμεσα στις ESBLs διαφορετικού τύπου.

Όσον αφορά τα προφίλ ευαισθησίας ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους ESBL, 112 (71.3 %) από τα 157 στελέχη που παρήγαγαν ESBL CTX-M-τύπου παρουσίασαν ευαισθησία σε μια τουλάχιστον κεφαλοσπορίνη; 6 (3.8 %), 88 (56.1 %) και 79 (50.3 %) στελέχη ήταν ευαίσθητα στην κεφοταξίμη, την κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη αντίστοιχα (Πίνακας 9). Ειδικότερα, από τα 66 στελέχη που φέρανε το *bla*<sub>CTX-M-15</sub> γονίδιο, 1 (1.5 %) ήταν ευαίσθητο στην κεφοταξίμη, ενώ 11 (16.7 %) και 27 (40.9 %) ήταν ευαίσθητα στην κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη αντίστοιχα. Ωστόσο, ανάμεσα στα 91 στελέχη που έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, ο βαθμός ευαισθησίας στις ESCs ήταν σημαντικά υψηλότερος, με 5 στελέχη (5.5 %) να είναι ευαίσθητα στην κεφοταξίμη, 77 (84.6 %) στην κεφταζιδίμη και 52 (57.1 %) στην κεφεπίμη (Πίνακας 9). Ανάμεσα στα στελέχη που παρήγαγαν SHV-5 ESBL, 7 (15.6 %) βρέθηκαν ευαίσθητα στην κεφοταξίμη, 2 (4.4 %) στην κεφταζιδίμη και 33 (73.3 %) στην κεφεπίμη.

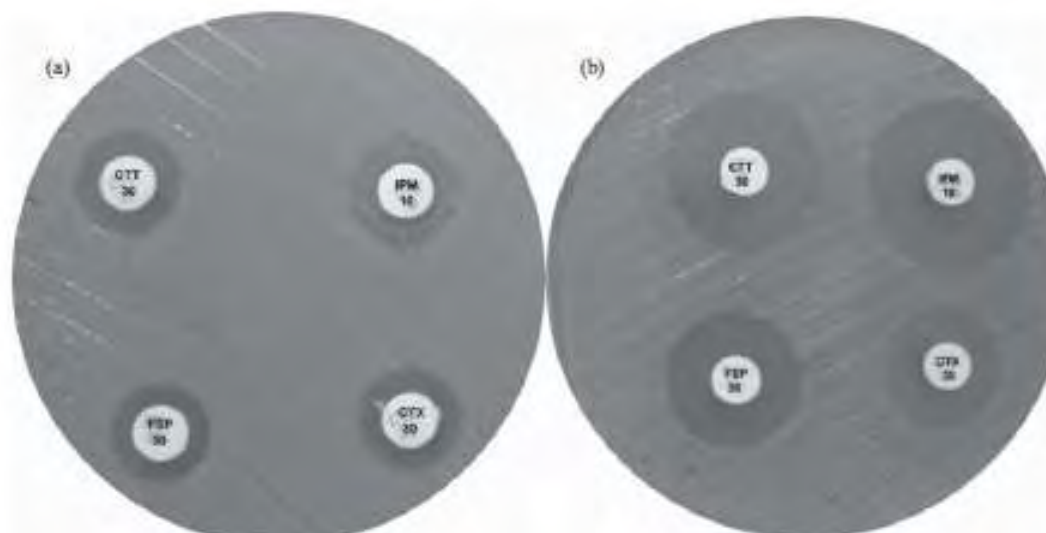
## 2.2 Αποτελέσματα ανίχνευσης KPC καρβαπενεμάσης με τη νέα μέθοδο δισκίων βορονικού οξέος

Το στέλεχος *K. pneumoniae* M410 απομονώθηκε, το 2008, από δείγμα ούρων μιας νέας γυναίκας στο Γενικό Νοσοκομείο Σερρών. Οι MICs β-λακταμικών αντιβιοτικών ενάντια στο στέλεχος αυτό παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Το στέλεχος παρουσίαζε αντοχή σε όλες τις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη, MICs των 32, 32 και 64 mg/L αντίστοιχα) όπως και τις διάφορες πενικιλλίνες, τους συνδυασμούς β-λακταμικών/αναστολέων, τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και την αζτρεονάμη. Η εφαρμογή του τροποποιημένου Hodge τεστ έδειξε την παραγωγή μιας καρβαπενεμάσης, αλλά το MBL Etest και ο έλεγχος με συνδυασμό δίσκων αντιβιοτικών ήταν αρνητικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης κλάσης B.

Antibiotic <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i> M410
Imipenem	32
Meropenem	32
Ertapenem	64
Aztreonam	>256
Cefotaxime	128
Cefepime	64
Ceftazidime	>256
Cefoxitin	64
Amoxicillin	>256
Amoxicillin + CLA	128
Piperacillin	>256
Piperacillin + TZB	>256

**Πίνακας 11.** MICs β-λακταμικών αντιβιοτικών για την *K. pneumoniae* M410

Η PCR για τα γονίδια ESBL και η αλληλούχισή τους έδειξε την παρουσία των γονιδίων *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub> και *bla*<sub>SHV-12</sub>. Ο έλεγχος με PCR για όλα τα γνωστά πλασμιδιακά γονίδια AmpC ήταν αρνητικός. Παρόλη την απουσία AmpC-τύπου λακταμάσης, ο έλεγχος με τη χρήση δισκίων βορονικού οξέος ως αναστολέα και διάφορα β-λακταμικά ως υπόστρωμα ήταν θετικός. Οι δοκιμασίες έδειξαν μια αύξηση  $\geq 5$  mm στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής στους συνδυασμένους δίσκους συγκριτικά με τα δισκία κεφοτετάνης, κεφοξιτίνης ή κεφοταξίμης χωρίς το βορονικό. Το βορονικό οξύ ενίσχυσε επίσης σημαντικά ( $> 8$  mm) την δράση της κεφεπίμης και όλων των καρβαπενεμών (ιμιπενέμης, μεροπενέμης, και ερταπενέμης), γεγονός που υποδεικνύει την ανασταλτική δράση του βορονικού ενάντια στο KPC ένζυμο (**Εικόνα 20 a και b**). Ωστόσο, η αναστολή δεν επηρέασε την δραστηριότητα της κεφταζιδίμης ή της αζτρεονάμης πιθανώς εξαιτίας της παρουσίας της ESBL SHV-τύπου, η οποία δεν επηρεάζεται από το βορονικό οξύ.



**Εικόνα 20.** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της μεθόδου βορονικού οξέος, χωρίς (a) και με βορονικό οξύ (b) για το στέλεχος *K. pneumoniae* M410 χρησιμοποιώντας δισκία κεφοτετάνης, ιμιπενέμης, κεφεπίμης και κεφοταξίμης.

## 2.3 Αποτελέσματα αξιολόγησης της νέας μεθόδου δίσκων βορονικού οξέος

Δοκιμές δισκίων με βορονικό οξύ χρησιμοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα αντιβιοτικών αξιολογήθηκαν για την ανίχνευση των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC. Εξετάστηκε ένας συνολικός αριθμός 57 γονοτυπικά επιβεβαιωμένων στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC και παρουσίαζαν ποικίλες MICs στις καρβαπενέμες. Για να εκτιμηθεί η ειδικότητα του τεστ εξετάστηκαν επίσης, 106 στελέχη αρνητικά για KPC (89 στελέχη *K. pneumoniae* και 17 στελέχη *E. coli*) τα οποία συλλέχθηκαν τυχαία ανάμεσα σε στελέχη που παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία στην κεφοξιτίνη, τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος ή τις καρβαπενέμες.

### 2.3.1 Αποτελέσματα ελέγχου αντιμικροβιακής ευαισθησίας (MICs)

Οι MICs στις καρβαπενέμες στα 57 KPC-θετικά στελέχη κυμαίνονταν από 4 έως 64 µg/ml για την ιμιπενέμη, από 2 έως 64 µg/ml για τη μεροπενέμη και από 4 έως 128 για την ερταπενέμη. 10 από τα στελέχη που παρήγαγαν KPC ήταν ευαίσθητα στη μεροπενέμη (MICs 2 – 4 µg/ml), ευαίσθητα ή μέτριας ευαισθησίας στην ιμιπενέμη (MICs 4 – 8 µg/ml) και μέτριας ευαισθησίας ή ανθεκτικά στην ερταπενέμη (MICs 4 – 16 µg/ml), ενώ τα υπόλοιπα 47 στελέχη ήταν είτε μέτριας ευαισθησίας, είτε ανθεκτικά

στις τρεις καρβαπενέμες (**Πίνακα 12**). Τα KPC-θετικά στελέχη παρουσίασαν αντοχή στις πενικιλίνες (αμπικιλίνη, και πιπερακιλλίνη), στους συνδυασμούς β-λακταμών και αναστολέων (αμοξυκιλλίνη – κλαβουλανικό οξύ, πιπερακιλλίνη – ταζοβακτάμη), την κεφοξιτίνη, κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη) και την αζτρεονάμη. Επιπλέον, όλα τα στελέχη που παρήγαγαν KPC είχαν αντοχή στην σιπροφλοξασίνη, ενώ 51 παρουσίασαν αντοχή στην τριμεθοπρίμη, 23 στην αμικασίνη, 6 στην κολιστίνη και 4 στη γενταμικίνη, αλλά κανένα δεν ήταν ανθεκτικό στη τιγκεκυκλίνη (MICs 0.5 – 2 µg/ml).

Ανάμεσα στα 106 KPC-αρνητικά στελέχη, 61 ήταν μη-ευαίσθητα (MICs ιμιπενέμης και μεροπενέμης > 4 µg/ml; MICs ερταπενέμης > 2 µg/ml) σε τουλάχιστον ένα από τις τρεις καρβαπενέμες (**Πίνακας 12**). Επιπλέον, 93, 100, και 99 ήταν μη-ευαίσθητα (MIC > 84 µg/ml) στην κεφοταξίμη, την κεφταζιδίμη και την κεφοταξίμη αντίστοιχα.

**Πίνακας 12.** MICs στις καρβαπενέμες για στελέχη υπό μελέτη

Characteristic of strain group (by PCR-confirmed β-lactamase content) and antimicrobial	No. of isolates with a MIC (µg/ml) of:									
	<1	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
KPC and KPC/ESBL positive (n = 57)										
Imipenem				9	10	14	18	6		
Meropenem			2	8	11	13	15	8		
Ertapenem				1	10	13	17	11	3	2
VIM and VIM/ESBL positive (n = 53)										
Imipenem				3	8	14	19	7	2	
Meropenem			2	4	12	18	13	4		
Ertapenem				2	11	10	15	12	3	
AmpC and AmpC/ESBL positive (n = 40)										
Imipenem	22	11	2	3	2					
Meropenem	29	8	3							
Ertapenem	24	5	3	1	1	3	3			
ESBL positive (n = 13)										
Imipenem	9	4								
Meropenem	12	1								
Ertapenem	10	3								

### 2.3.2 Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου για τα γονίδια β-λακταμασών

Η αλληλούχιση 10 τυχαία επιλεγμένων στελεχών θετικών για KPC έδειξε την ύπαρξη του γονιδίου *bla<sub>KPC-2</sub>*. Ο μοριακός έλεγχος έδειξε ότι 48 από τα 57 KPC-θετικά στελέχη ήταν θετικά και για SHV-τύπου ESB�. Η αλληλούχιση έδειξε την ύπαρξη της SHV-11 σε δύο στελέχη και της SHV-12 στα υπόλοιπα 46. Η PCR για άλλα γονίδια ESB� (CTX-M, TEM, GES/IBC) όπως και για γονίδια MBL και όλα τα γνωστά πλασμιδιακά γονίδια AmpC ήταν αρνητική, ενώ 26 από τα 57 KPC-θετικά στελέχη έφεραν την TEM-1 β-λακταμάση.

Ο μοριακός έλεγχος των 106 KPC-αρνητικών στελεχών έδειξε ότι 53 στελέχη έφεραν VIM-τύπου MBL, 56 έφεραν ESB� (33 στελέχη έφεραν SHV-τύπου ESB�, 19 στελέχη έφεραν CTX-M-τύπου ESB�, 2 στελέχη έφεραν SHV και TEM-τύπου ESB�s και 2 έφεραν GES/IBC-τύπου ESB�s) και 40 έφεραν AmpC β-λακταμάσες, οι οποίες ανήκαν στις δύο από τις έξι ομάδες πλασμιδιακών AmpC ενζύμων (24 ανήκαν στην ομάδα που συμπεριλαμβάνει MOX-1, MOX-2, CMY-1 και CMY-8 – CMY-11, και 16 ανήκανε στην ομάδα που συμπεριλαμβάνει LAT-1 – LAT-4, CMY-2 – CMY-7 και BIL-1).

### 2.3.3 Αποτελέσματα ελέγχου με τη μέθοδο δισκίων βορονικού οξέος. Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική και αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου

Αναλυτικά τα αποτελέσματα του ελέγχου με τα δισκία βορονικού οξέος εμφανίζονται στον **Πίνακα 13**, ενώ οι ευαισθησίες, ειδικότητες, η θετική προγνωστική αξία και η αρνητική προγνωστική αξία εμφανίζονται στον **Πίνακα 14**. Και τα 57 KPC-θετικά στελέχη έδειξαν αύξηση 5 χιλ. ή μεγαλύτερη στη διάμετρο της ζώνης αναστολής των συνδυασμένων δισκίων σε σχέση με αυτά που είχαν μόνο κεφοτετάνη ή κεφεπίμη (ευαισθησία 100%). Το βορονικό οξύ επίσης ενίσχυσε σημαντικά ( $\geq 7$  χιλ.) τη δραστηριότητα και των τριών καρβαπενεμών (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη) και για τα 57 KPC-θετικά στελέχη (ευαισθησία 100%) ανεξαρτήτως των MICs στις καρβαπενέμες, υποδεικνύοντας την ανασταλτική δράση του βορονικού οξέος ενάντια στα KPC ένζυμα (**Εικόνα 21**).

**Πίνακας 13.** Αποτελέσματα των ελέγχων με δισκία βορονικού οξέος για τα στελέχη με διάφορες β-λακταμάσες

Characteristic of strain group (by PCR-confirmed β-lactamase content)	No. (%) of isolates positive by the boronic acid test <sup>a</sup> with:							
	IPM	MER	ETP	FEP	CTT	FOX	CTX	CAZ
KPC positive ( <i>n</i> = 9)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)
KPC/ESBL positive ( <i>n</i> = 48)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	46 (95.8)	29 (60.4)	2 (4.2)
Total KPC-possessing isolates ( <i>n</i> = 57)	57 (100)	57 (100)	57 (100)	57 (100)	57 (100)	55 (96.5)	38 (66.7)	11 (19.3)
VIM positive ( <i>n</i> = 41)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (4.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
VIM/ESBL positive ( <i>n</i> = 12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AmpC positive ( <i>n</i> = 9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (100)	8 (88.9)	8 (88.9)	7 (77.8)
AmpC/ESBL positive ( <i>n</i> = 31)	0 (0)	0 (0)	5 (16.1)	0 (0)	31 (100)	24 (77.4)	11 (35.5)	6 (19.4)
ESBL positive ( <i>n</i> = 13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total non-KPC-possessing isolates ( <i>n</i> = 106)	0 (0)	0 (0)	5 (4.7)	0 (0)	42 (39.6)	32 (30.2)	19 (17.9)	13 (12.3)

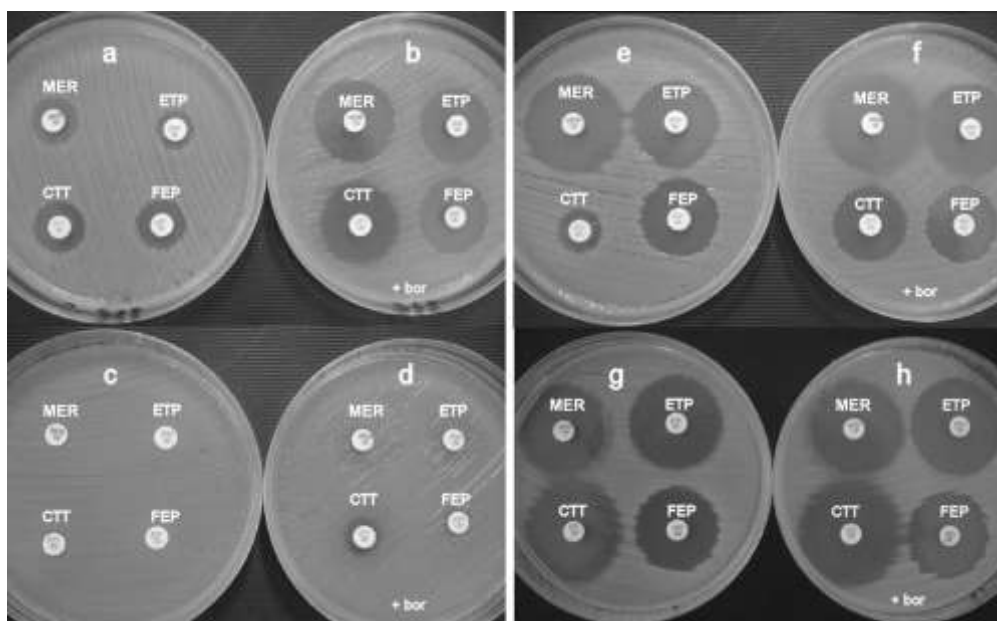
Συντομογραφίες: IPM, ιμιπενέμη; MER, μεροπενέμη; ETP, ερταπενέμη; FEP, κεφεπίμη; CTT, κεφοτετάνη; FOX, κεφοξιδίνη; CTX, κεφοταξιδίμη; CAZ, κεφαζιδίμη

**Πίνακας 14.** Σύνοψη των ευαισθησιών, ειδικοτήτων, θετικών προγνωστικών αξιών, και αρνητικών προγνωστικών αξιών των ελέγχων με βορονικό οξύ χρησιμοποιώντας διάφορα αντιβιοτικά υποστρώματα στη φαινοτυπική ανίχνευση των KPC-θετικών

Antibiotic used in boronic acid disk test	No. (%) of isolates confirmed by PCR as:		Test performance <sup>a</sup> (%)			
	Possessing KPC ( <i>n</i> = 57)	Not possessing KPC ( <i>n</i> = 106)	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Imipenem	57 (100)	0 (0)	100	100	100	100
Meropenem	57 (100)	0 (0)	100	100	100	100
Ertapenem	57 (100)	5 (4.7)	100	95.3	91.9	100
Cefepime	57 (100)	0 (0)	100	100	100	100
Cefotetan	57 (100)	42 (39.6)	100	60.4	57.6	100
Cefoxitin	55 (96.5)	32 (30.2)	96.5	69.8	63.2	97.4
Cefotaxime	38 (66.7)	19 (17.9)	66.7	82.1	66.7	82.1
Ceftazidime	11 (19.3)	13 (12.3)	19.3	87.7	45.8	66.9

<sup>a</sup> PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.





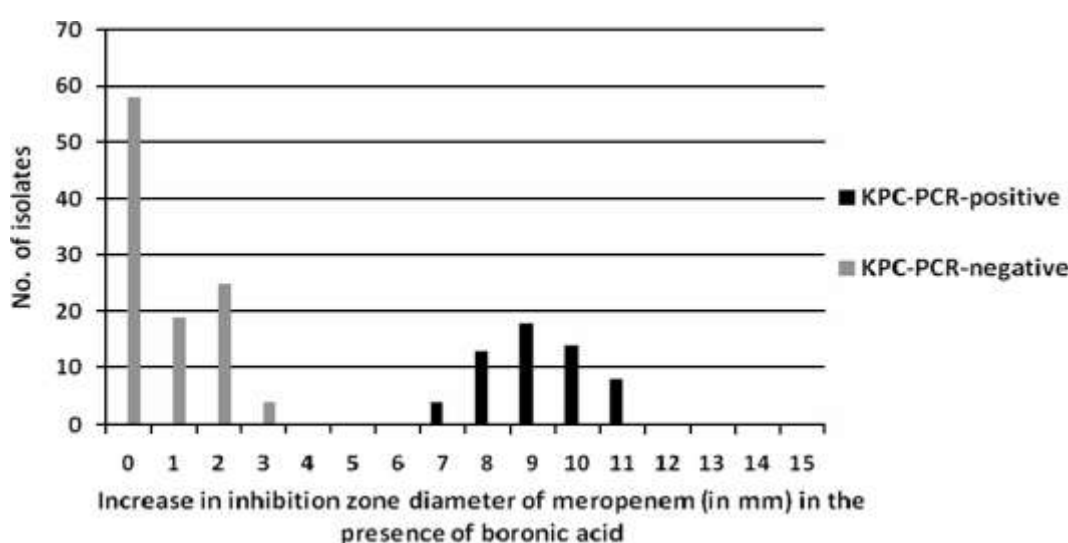
**Εικόνα 21.** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο δισκίων βορονικού οξέος χωρίς και με βορονικό οξύ για KPC/ESBL (a και b), VIM (c και d), AmpC/ESBL (e και f), ή ESBL (g και h) με υποστρώματα τη MER (μεροπενέμη), ETP (ερταπενέμη), CTT (κεφοτετάνη), FEP (κεφεπίμη).

Η **εικόνα 21a** και **b** δείχνουν το πρότυπο ανάπτυξης αντιπροσωπευτικών KPC-θετικών στελεχών *K. pneumoniae* με και χωρίς βορονικό οξύ, και με αντιβιοτικά υποστρώματα την μεροπενέμη, την ερταπενέμη, την κεφοτετάνη και την κεφεπίμη. Η μέθοδος αυτή έδειξε χαμηλότερη ευαισθησία όταν χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα η κεφοξιτίνη και η κεφοταξίμη (96.5 % ή 66.7 % αντίστοιχα). Ο αναστολέας επηρέασε τη δράση της κεφαζιδίμης έναντι των 9 ESBL-αρνητικών στελεχών, όπως και των 2 SHV-11-θετικών στελεχών, όχι όμως έναντι των 46 υπολοίπων SHV-12-θετικών στελεχών (ευαισθησία 19.3 %), πιθανώς λόγω της SHV-12ESBL, η οποία δεν επηρεάζεται από το βορονικό οξύ.

Κανένα από τα 106 KPC-αρνητικά στελέχη δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα στο τεστ βορονικού οξέος χρησιμοποιώντας δισκία κεφεπίμης, ιμιπενέμης ή μεροπενέμης (ειδικότητα 100 %) (**Πίνακας 13, 14**). Όταν χρησιμοποιήθηκαν δισκία ερταπενέμης, όλα τα KPC-αρνητικά στελέχη, σωστά προσδιορίστηκαν ως KPC-αρνητικά εκτός από 5 AmpC-θετικά που έδωσαν ψευδώς-θετικά αποτελέσματα (ειδικότητα 95.3 %) (**Πίνακας 13, 14**). Οι έλεγχοι βορονικού οξέος χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα την κεφοτετάνη, την κεφοξιτίνη, την κεφοταξίμη και την κεφαζιδίμη ήταν θετικά για 42, 32, 19 και 13 στελέχη αντίστοιχα (ειδικότητες για την ανίχνευση της KPC



κυμαίνονταν από 60.4 έως 87.7) (Πίνακας 14). Η εικόνα 21 c – h δείχνει τα πρότυπα ανάπτυξης τριών αντιπροσωπευτικών KPC-αρνητικών στελεχών *K. pneumoniae* (που φέρανε VIM, AmpC, και ESBL, αντίστοιχα) χωρίς ή με βορονικό οξύ και με υποστρώματα τη μεροπενέμη, την ερταπενέμη, την κεφοτετάνη, και την κεφεπίμη. Οι έλεγχοι αυτοί έγιναν εις διπλούν και τα αποτελέσματα ήταν επαναλήψιμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ανάμεσα στα τρία αντιβιοτικά (ιμιπενέμη, μεροπενέμη και κεφεπίμη) που διαφοροποίησαν σωστά όλα τα 163 στελέχη υπό μελέτη, η μεροπενέμη έδειξε τις μεγαλύτερες διαφορές στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής μεταξύ των KPC-θετικών και KPC-αρνητικών στελεχών (Εικόνα 22).



**Εικόνα 22.** Αυξήσεις στη διάμετρο ζωνών αναστολής για την μεροπενέμη (σε χιλιοστά) παρουσία βορονικού οξέος για τα 57 KPC-θετικά στελέχη και 106 KPC-αρνητικά στελέχη.

## 2.4. Αποτελέσματα μελέτης ετερογενούς αντοχής στη μεροπενέμη σε στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση

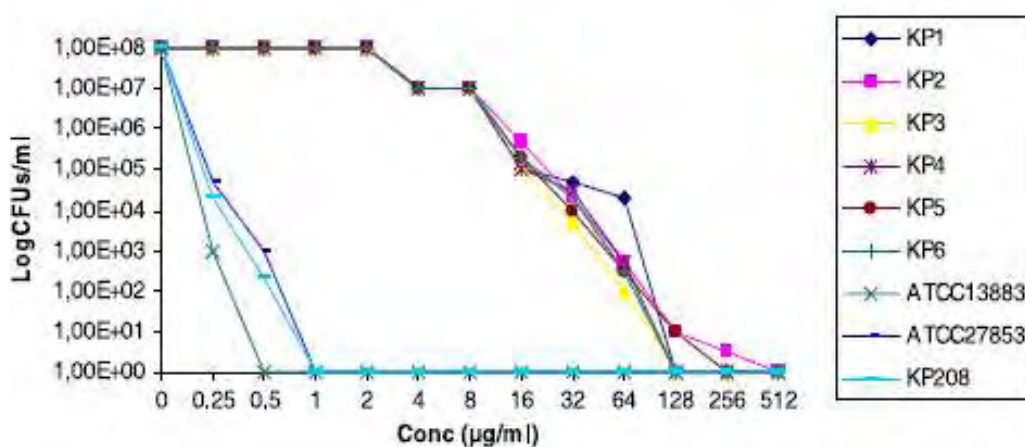
### 2.4.1 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής ευαισθησίας των βακτηριακών στελεχών

6 στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-2 (KPC-KP) επιλέχθηκαν τυχαία από τη συλλογή ανάμεσα σ' εκείνα που ήταν ευαίσθητα στη μεροπενέμη με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ ( $\leq 4 \mu\text{g.ml}$ ) (CLSI 2007) και παρουσίαζαν διάσπαρτες ετερογενείς αποικίες στη ζώνη αναστολής γύρω από τα δισκία καρβαπενεμών.

Οι MICs στη μεροπενέμη με Etest των στελεχών KPC-KP κυμαίνονταν από 1 έως 4  $\mu\text{g/ml}$ , όμως οι ετερογενείς αποικίες στη ζώνη αναστολής στα E-test παρατηρήθηκαν σε συγκεντρώσεις μεροπενέμης 6 – 32  $\mu\text{g/ml}$ . Τα στελέχη KPC-KP είχαν MICs (με τη μέθοδο των αραιώσεων σε άγαρ) στην ιμιπενέμη, τη μεροπενέμη και την ερταπενέμη 4 – 16  $\mu\text{g/ml}$ , 2 – 4  $\mu\text{g/ml}$ , και 8 – 32  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα. Επίσης, παρουσίασαν αντοχή στις περισσότερες αντιμικροβιακές κλάσεις και ήταν ευαίσθητα μόνο στην κολιστίνη, την τιγεκυκλίνη, και τη γενταμικίνη.

#### 2.4.2 Αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάλυσης και qRT-PCR

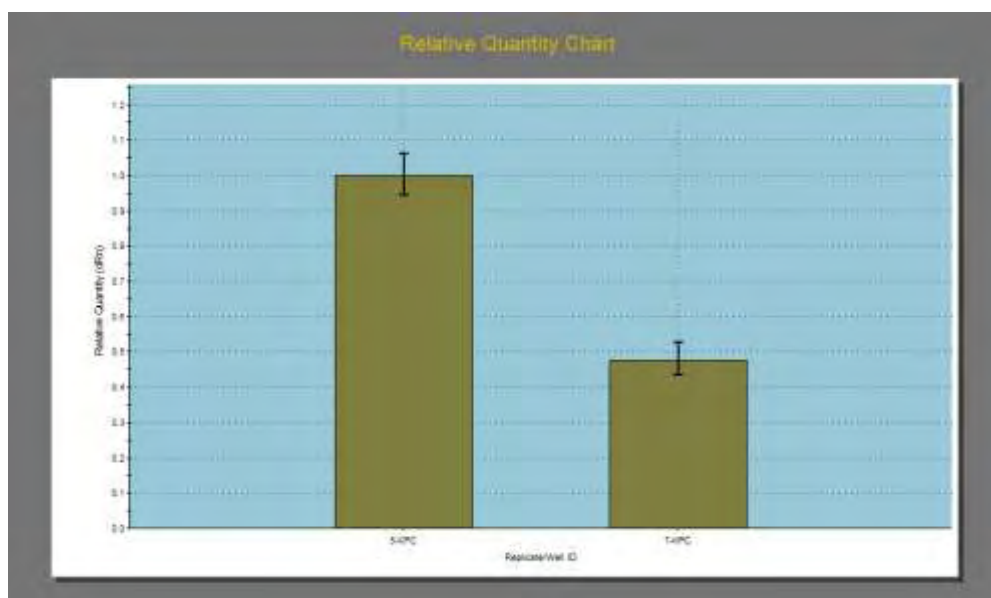
Η πληθυσμιακή ανάλυση για την μεροπενέμη έδειξε ότι  $2.3 \times 10^{-5}$  έως  $1.5 \times 10^{-8}$  του αρχικού ενοφθαλμίσματος αναπτύχθηκε σε συγκεντρώσεις από 64 – 256  $\mu\text{g/ml}$  και για τα έξι KPC-KP στελέχη (16 έως 128 φορές των MICs τους), ενώ τα στελέχη ελέγχου αναπτύχθηκαν μέχρι τέσσερις φορές των αρχικών τους MICs στη μεροπενέμη (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Καμπύλες πληθυσμιακής ανάπτυξης για τα στελέχη KPC-KP με αντιβιοτικό την μεροπενέμη

Οι MICs στη μεροπενέμη των ετερογενών πληθυσμών μετά από μια εβδομάδα ανακαλλιέργειών σε μέσο χωρίς αντιβιοτικό κυμαίνονταν από 4 – 8  $\mu\text{g/ml}$ , ίδιες ή ελαφρώς υψηλότερες από αυτές των μητρικών στελεχών. Η qRT-PCR έδειξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του *bla*<sub>KPC-2</sub> γονιδίου των ετερογενών υποπληθυσμών, που εξετάστηκαν την ίδια μέρα λήψης από το τρυβλίο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μεροπενέμης, σε όλα τα στελέχη, συγκριτικά με τις

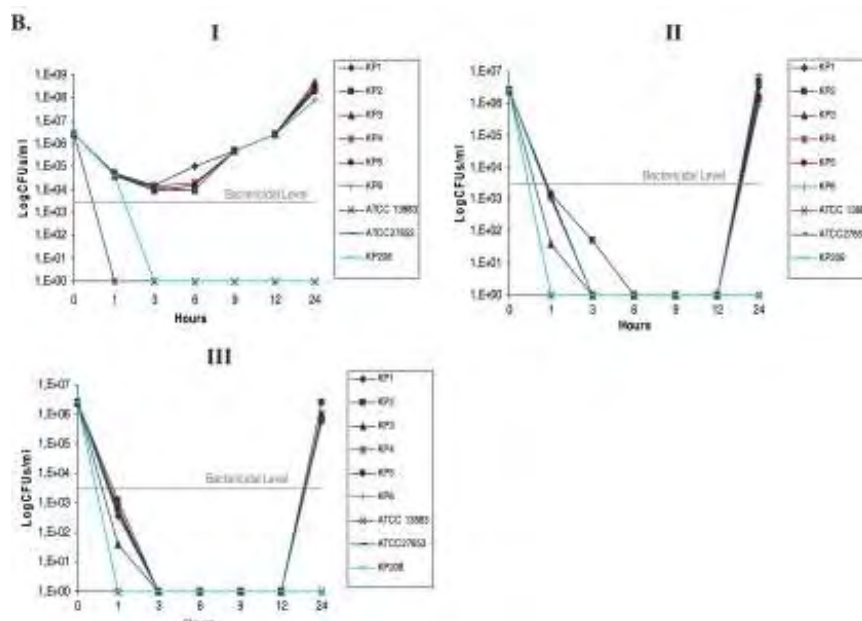
μητρικές αποικίες (από 0.475 έως 1.07 φορές παραπάνω,  $P < 0.01$ ) (Εικόνα 24). Αντίθετα, η έκφραση του *bla*<sub>KPC-2</sub> δεν διέφερε μεταξύ μητρικών και ετερογενών αποικιών μετά από επτά ανακαλλιέργειες σε μέσο χωρίς αντιβιοτικό. Είναι επομένως πιθανόν ότι τα επίπεδα έκφρασης να έχουν συμβάλει στον ετερογενή φαινότυπο.



**Εικόνα 24.** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της qRT-PCR σχετικά με την έκφραση του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου για την ετερογενή αποικία (αριστερά) και τη μητρική αποικία (δεξιά) για ένα από τα στελέχη KPC-KP

### 2.4.3 Μικροβιοκτόνες δοκιμασίες (Time Killing assays)

Η μικροβιοκτόνος μελέτη χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα αντιμικροβιακά σε συγκέντρωση 1 X MIC έδειξε ότι η μεροπενέμη όταν εξετάστηκε μόνη της δεν κατέδειξε βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στα στελέχη KPC-KP της μελέτης. Παρόλο που παρατηρήθηκε μια μέτρια μείωση στον αριθμό βιώσιμων κυττάρων μεταξύ 1 και 6 ωρών επώασης, μία σημαντική εκ νέου βακτηριακή ανάπτυξη ανιχνεύτηκε σε όλα τα KPC-KP στελέχη (Εικ 25, πάνελ I).



**Εικόνα 25.** Βακτηριοκτόνες δοκιμασίες των στελεχών KPC-KP και στελεχών ελέγχου σε ζωμό Mueller-Hinton με 1 X MIC μεροπενέμης (πάνελ I), γενταμικίνης (πάνελ II), και μεροπενέμης συν γενταμικίνης (πάνελ III).

Η γενταμικίνη ήταν βακτηριοκτόνα έναντι όλων στελεχών KPC-KP που ελέγχθηκαν (Εικόνα 25, πάνελ II), ενώ ο συνδυασμός μεροπενέμης και γενταμικίνης θανάτωσε πιο γρήγορα όλα τα στελέχη KPC-KP (Εικόνα 25, πάνελ III). Τα στελέχη ελέγχου θανατώθηκαν απ' όλα τα αντιβιοτικά, μόνα τους ή σε συνδυασμό, και δεν παρατηρήθηκε καμία εκ νέου ανάπτυξη.

## 2.5 Ανίχνευση νέας μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-19 σε στέλεχος *K. pneumoniae* που παρήγαγε συγχρόνως τις β-λακταμάσες KPC-2, CMY-2 και CTX-M-15.

Το στέλεχος KP 1935 ήταν ανθεκτικό η μέτριας αντοχής σε όλα τα β-λακταμικά, συμπεριλαμβάνοντας τις καρβαπενέμες, με MICs για την ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη 32, 16 και 64 mg/L αντίστοιχα. Επίσης, παρουσίαζε αντοχή σε όλα σχεδόν τα εναλλακτικά αντιμικροβιακά, συμπεριλαμβάνοντας την κολιστίνη (MIC 16mg/L), και ήταν ευαίσθητο μόνο στην τιγκεκυκλίνη (MIC 2 mg/L) (Πίνακας 15).

**Πίνακας 15.** MICs αντιβιοτικών για το στέλεχος KP 1935

MICs (µg/ml)	
Antibiotic	KP1935 (VIM-19+ KPC-2+ CTX-M-15)
Imipenem	32
Meropenem	16
Ertapenem	64
Ampicillin	>32
Amoxicillin + CLA	>256
Piperacillin + TZB	>256
Aztreonam	>256
Ceftazidime	>256
Cefotaxime	>32
Cefepime	128
Cefoxitin	>256
Ciprofloxacin	>32
Gentamicin	64
Amikacin	16
Trimethoprim	>256
Tetracycline	>256
Tigecycline	2
Colistin	16

Η ταυτόχρονη ύπαρξη των δύο καρβαπενεμασών MBL και KPC υποδείχθηκε από ένα θετικό τεστ συνδυασμένων δισκίων χρησιμοποιώντας δισκίο μεροπενέμης με EDTA και βορονικό οξύ συγχρόνως, ενώ τα δισκία μεροπενέμης μόνο με EDTA ή μόνο με βορονικό ήταν αρνητικά. Η PCR για τα γονίδια β-λακταμασών έδειξε ότι η KP1935 ήταν θετική για τα γονίδια *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> και *bla*<sub>KPC</sub> και αρνητική για τα υπόλοιπα γονίδια που ελέγχθηκαν, συμπεριλαμβανοντας όλες τις *bla*<sub>SHV</sub> παραλλαγές. Η ανάλυση αλληλουχιών προσδιόρισε τα *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>VIM-19</sub> και *bla*<sub>KPC-2</sub> αλληλία. Η PCR και η αλληλούχιση χρησιμοποιώντας εκκινητές 5' –CS και 3' –CS σε διάφορους συνδυασμούς με εκκινητές για τα *bla*<sub>VIM</sub>, *aacA*, *aadA*, και *dfrA1* γονίδια αποκάλυψε ένα νέο ιντεγκρόνιο κλάσης 1 με τη δομή που φαίνεται στην **Εικόνα 26**. Η κασέτα του γονιδίου *bla*<sub>VIM-19</sub> ήταν εντοπισμένη μετά την θέση ανασυνδυασμού *attI1*, ακολουθούμενο από μία κασέτα *aacA6*, μία κασέτα *dfrA1*, και μία κασέτα *aadA1*, και με το 3' –CS άκρο να έχει τη *qacED1* και τη *sulI*.

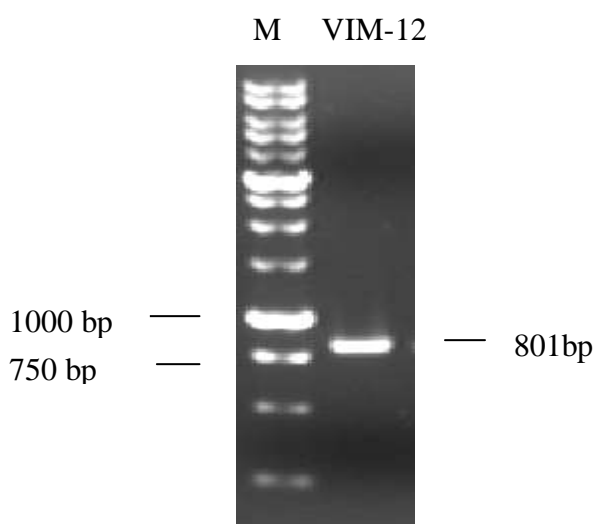


**Εικόνα 26.** Σχηματική αναπαράσταση του ιντεγκρονίου κλάσης Ι του στελέγους ΚΡ 1935

## 2.6 Βιοχημικός χαρακτηρισμός νέας «υβριδικής» μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12

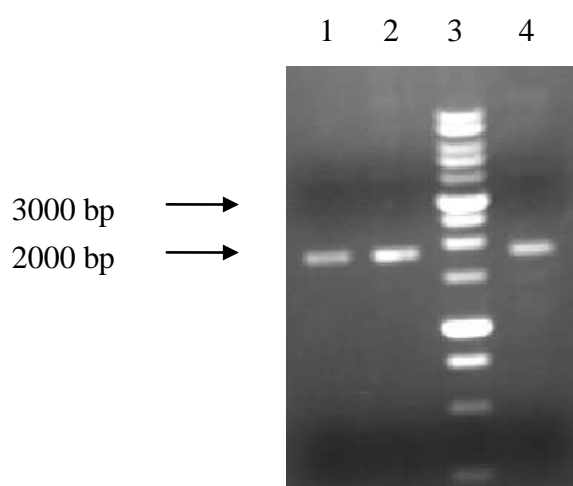
### 2.6.1 Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου VIM-12

Η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αγαρόζης έδειξε την παρουσία μιας καθαρής ζώνης DNA στο αναμενόμενο μέγεθος, 801 bp (**Εικόνα 27**) που αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου VIM-12. Το συγκεκριμένο DNA εκχυλίστηκε από την πηκτή αγαρόζης και χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση σύνδεσης με τον φορέα pGem – T Easy Vector. Με μια ποσότητα 10 μl έγινε ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων DH5α.

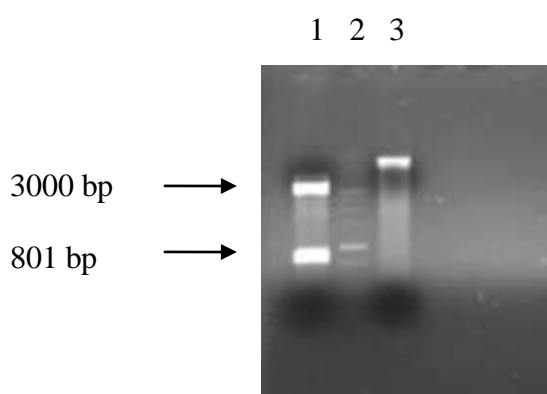


**Εικόνα 27.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR. Στην πρώτη σειρά είναι ο μάρτυρας μεγεθών και στη δεύτερη σειρά το προϊόν.

Από τις λευκές αποικίες που αναπτύχθηκαν έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (**Εικόνα 28**) η ανάλυση του οποίου με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI έδειξε την ύπαρξη δύο ζωνών, του ανοιχτού φορέα pGem-T Easy (3000 bp) και του γονιδίου VIM-12 (801bp) (**Εικόνα 29**).

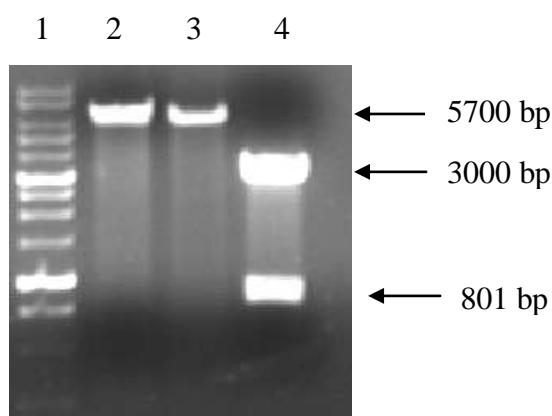


**Εικόνα 28.** Ηλεκτροφόρηση μετά από πλασμιδιακή απομόνωση.  
Στις σειρές 1, 2, 4 είναι διαφορετικές αποικίες κυττάρων *E.coli*.

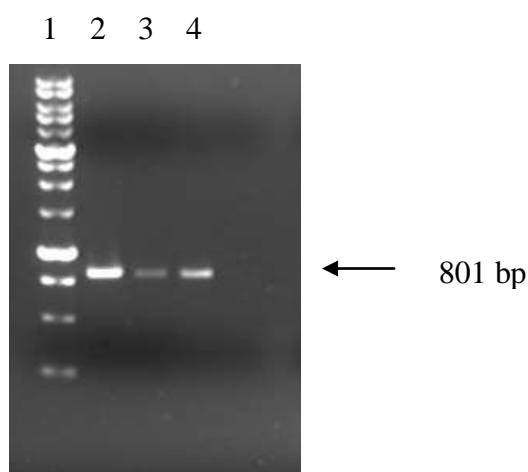


**Εικόνα 29.** Πένψη πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα DH5α.  
Σειρά 1: φορέας μετά από πένψη, σειρά 3: φορέας πριν την πένψη.

Τα κλάσματα του ανοιχτού φορέα pET 15b (5708bp) και του γονίδιο VIM12 (801bp) (**Εικόνα 30**) που προέκυψαν από την ανάλυση με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI του πλασμιδιακού DNA με το γονίδιο VIM-12 και του φορέα pET 15b συνδέθηκαν με την αντίδραση λιγάσης. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων BL21. Η PCR επιβεβαίωσε την ύπαρξη του γονιδίου VIM-12 στο πλασμιδιακό DNA των κυττάρων BL21 (**Εικόνα 31**).



**Εικόνα 30.** Πέψη με ένζυμα περιορισμού του φορέα pET 15b (σειρά 2, 3) και πλασμιδιακού DNA που περιέχει το φορέα pGEM με το γονίδιο VIM-12 (σειρά 4).

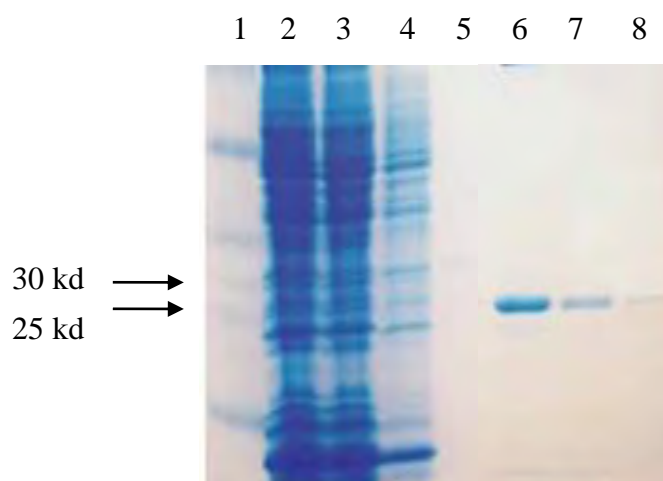


**Εικόνα 31.** Η ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR που πραγματοποιήθηκε σε πλασμιδιακό DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα BL 21.

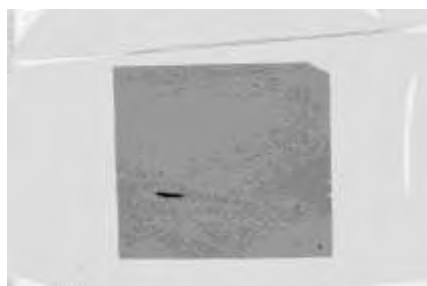
### 2.6.2 Υπερέκφραση, καθαρισμός και ανίχνευση της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης

Η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε στους 30<sup>0</sup>C για 4 ώρες με την προσθήκη IPTG και έγινε ο καθαρισμός της σε στήλη αгарόζης NTA-Ni. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (**Εικόνα 32**) έκανε δυνατή την ανίχνευση της πρωτεΐνης, η παρουσία της οποίας επιβεβαιώθηκε με την τεχνική Western Blotting (**Εικόνα 33**).





**Εικόνα 32.** Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Μάρτυρας μοριακών μεγεθών: σειρά 1, υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρωση: σειρά 2, υπερκείμενο μετά από το πέρασμά του στη στήλη: σειρά 3, δείγματα που προκύπτουν από την έκπλυση: σειρά 4,5 και δείγματα που προκύπτουν από την έκλουση σειρά: 6,7,8.

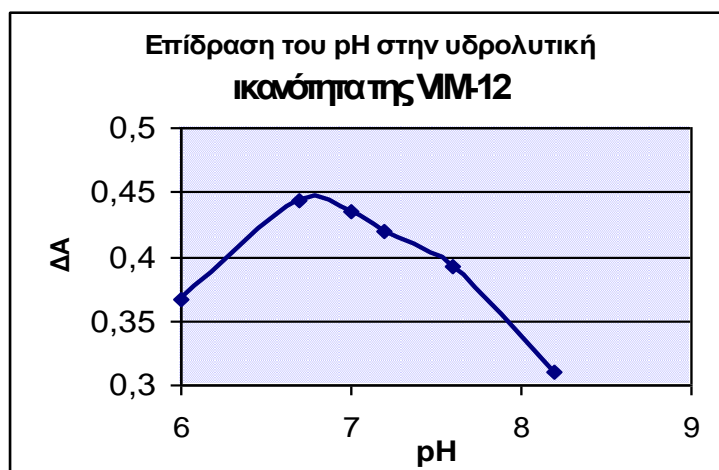


**Εικόνα 33.** Ανίχνευση της απομονωμένης VIM-12 λακταμάσης με τη τεχνική ανοσοαποτύπωσης..

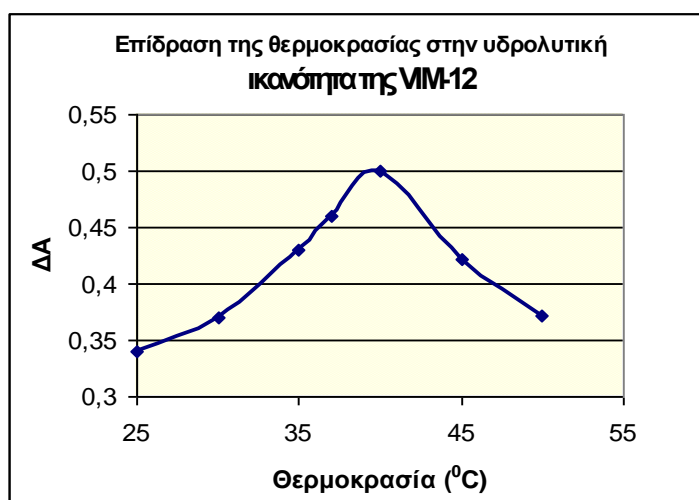
### 2.6.3 Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης της VIM-12

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό της VIM-12 έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες δράσης για το ένζυμο αυτό ήταν το pH 6.7 (**Εικόνα 34**) και η θερμοκρασία 40°C (**Εικόνα 35**).

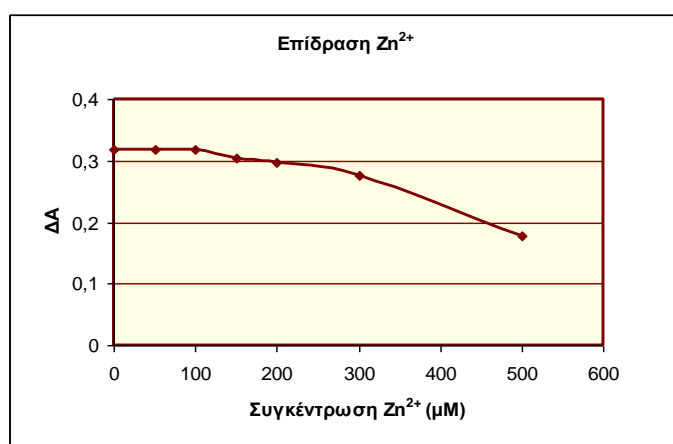
Όσον αφορά την επίδραση ιόντων  $Zn^{2+}$ , σε συγκεντρώσεις 50 και 100μM δεν επηρεάστηκε η υδρολυτική ικανότητα της VIM-12, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επίδρασαν αρνητικά μειώνοντας την δράση του ενζύμου (**Εικόνα 36**).



**Εικόνα 34.** Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης της VIM-12.

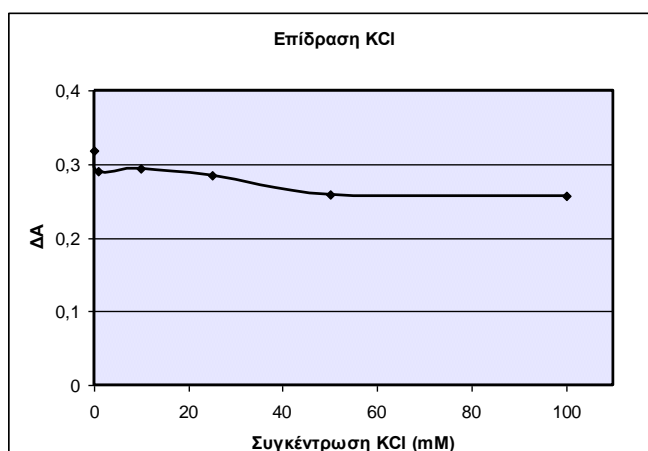


**Εικόνα 35.** Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας στη δράση της VIM-12



**Εικόνα 36.** Ο ρόλος των ιόντων ψευδαργύρου στη δράση της VIM-12.

Η προσθήκη του KCl μείωσε την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 37**.

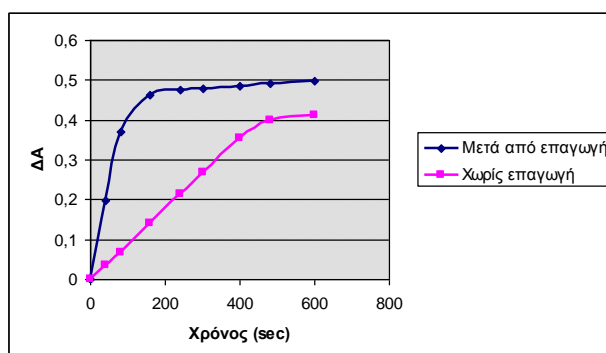


**Εικόνα 37.** Επίδραση του KCl στην υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου.

Η αντικατάσταση των ιόντων Zn με ιόντα Mn και Mg σε συγκεντρώσεις 50 και 100μM είχε την ίδια επίδραση στην υδρολυτική ικανότητα της VIM-12 όπως και τα ιόντα Zn στις ίδιες συγκεντρώσεις, δεν επηρέασαν την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου.

#### 2.6.4 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12

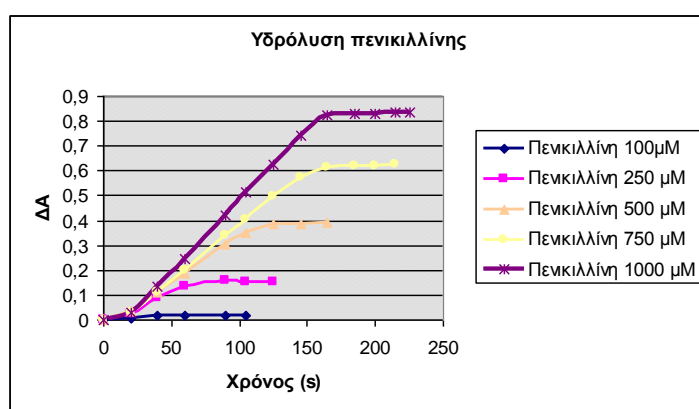
Το πείραμα ελέγχου που πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα την πενικιλίνη έδειξε ότι στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 χωρίς να έχει γίνει επαγωγή με IPTG, ο ρυθμός υδρόλυσης του αντιβιοτικού ήταν πολύ πιο χαμηλός σε σύγκριση με την περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα μετά από επαγωγή (**Εικόνα 38**).



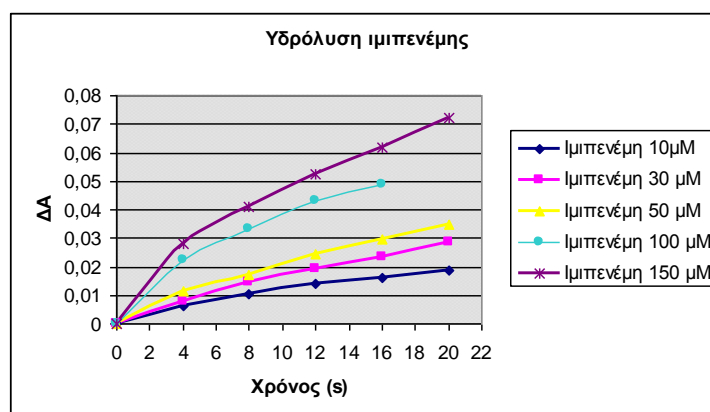
**Εικόνα 38.** Υδρόλυση πενικιλίνης χωρίς και μετά από επαγωγή.

Αυτό ήταν ένδειξη ότι η πρωτεΐνη μας υπερεκφράστηκε και η υδρόλυση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων οφειλόταν σ' αυτή.

Η μελέτη υδρόλυσης των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν έδειξε ότι το ένζυμο υδρόλυσε αρκετά καλά την πενικιλίνη και λιγότερο την ιμιπενέμη. Για την μεροπενέμη και την αζτρεονάμη δεν παρατηρήθηκε υδρόλυση. Έτσι, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προόδου της αντίδρασης για την πενικιλίνη και την ιμιπενέμη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Εικόνες 39, 40), όπως αναφέρθηκε παραπάνω και υπολογίστηκε η  $V_0$  για κάθε συγκέντρωση και για τα δύο αντιβιοτικά.

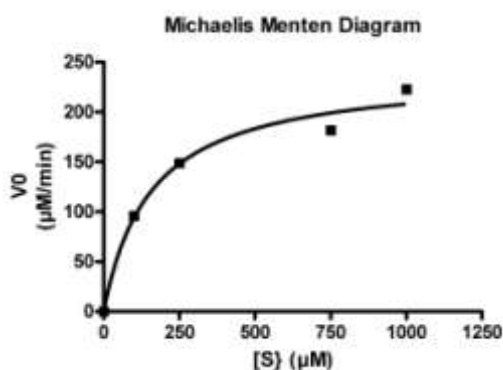


**Εικόνα 39.** Καμπύλες προόδου υδρόλυσης της πενικιλίνης σε συγκεντρώσεις 100, 250, 500, 750 και 1000 μΜ.

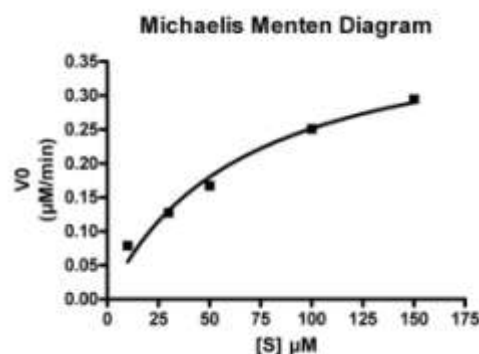


**Εικόνα 40.** Καμπύλες προόδου υδρόλυσης της ιμιπενέμης σε συγκεντρώσεις 10, 30, 50 και 150 μΜ.

Με τις τιμές  $V_0$  που βρέθηκαν κατασκευάστηκε το διάγραμμα Michaelis Menten για την πενικιλίνη και την ιμιπενέμη (Εικόνες 41, 42).



Εικόνα 41. Διάγραμμα Michaelis Menten για την πενικιλίνη.



Εικόνα 42. Διάγραμμα Michaelis Menten για την ιμιπενέμη.

Οι κινητικές παράμετροι που υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση Michaelis Menten ήταν για την πενικιλίνη:

$$K_M = 156.4 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 240.5 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_{\text{cat}} = 44.80 \text{ s}^{-1}$$

$$K_{\text{cat}} / K_M = 28.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

και για την ιμιπενέμη:

$$K_M = 66 \mu\text{M}$$

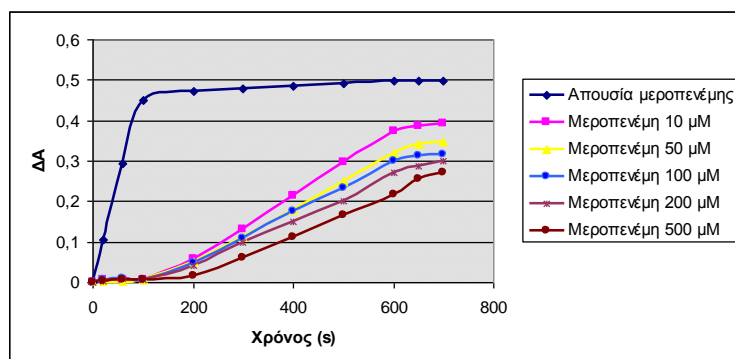
$$V_{\max} = 0.22 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_{\text{cat}} = 0.0012 \text{ s}^{-1}$$

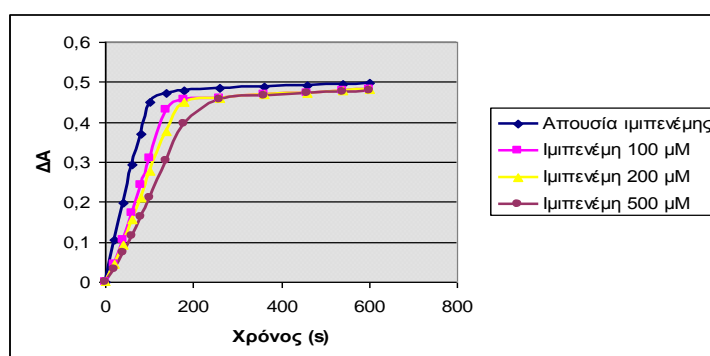
$$K_{\text{cat}} / K_M = 18.1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

### 2.6.5 Επίδραση συνδυασμού αντιβιοτικών στην δράση της VIM-12 και υπολογισμός των σταθερών αναστολής

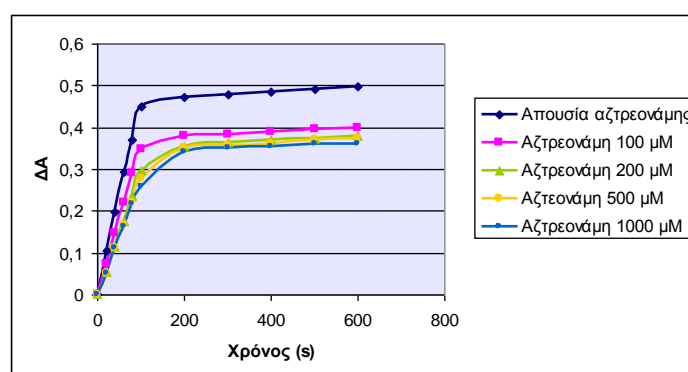
Τα πειράματα συνδυασμού αντιβιοτικών που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έδειξαν ότι και τα τρία αντιβιοτικά δρουν ως αναστολείς (Εικόνες 43, 44, 45). Για τον προσδιορισμό του είδους αναστολής που παρατηρήθηκε όπως και των σταθερών αναστολής, από τις καμπύλες υδρόλυσης διαφορετικών συγκεντρώσεων πενικιλίνης απουσία και παρουσία αναστολέων, υπολογίστηκαν οι αρχικές ταχύτητες  $V_0$  με τις οποίες κατασκευάστηκε το διάγραμμα Michaelis Menten (Εικόνα 46). Οι κινητικές παράμετροι που βρέθηκαν, σε κάθε περίπτωση, με βάση την εξίσωση Michaelis Menten παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.



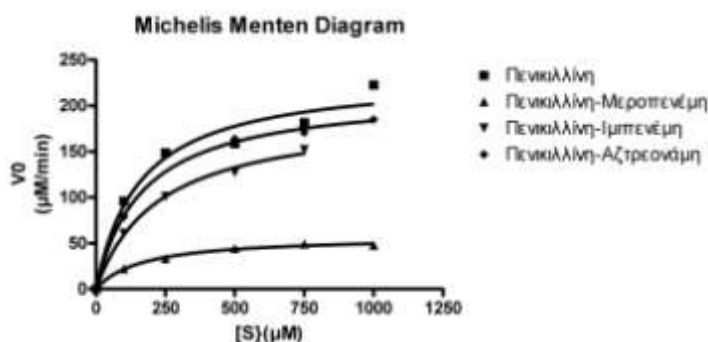
**Εικόνα 43.** Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων μεροπενέμης ως αναστολέας στην υδρόλυση της πενικιλίνης.



**Εικόνα 44.** Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιπενέμης ως αναστολέας στην υδρόλυση της πενικιλίνης.



**Εικόνα 45.** Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αζτρεονάμης ως αναστολέας στην υδρόλυση της πενικιλίνης.

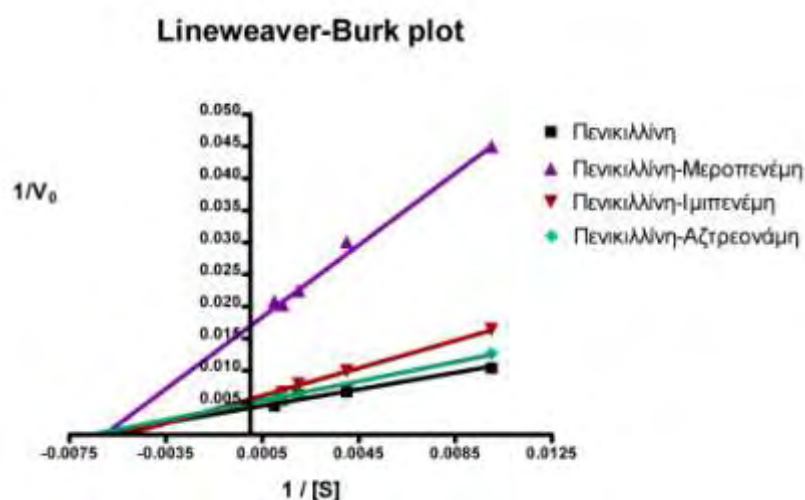


**Εικόνα 46.** Διάγραμμα Michaelis-Menten που παρουσιάζει την ταχύτητα της αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υποστρώματος για την πενικιλίνη απουσία αναστολέα και παρουσία μεροπενέμης, ιμιπενέμης και αζτρεονάμης.

**Πίνακας 16.** Κινητικές παράμετροι που υπολογίστηκαν για την πενικιλίνη απουσία και παρουσία αναστολέων.

	Απουσία αναστολέα	Παρουσία μεροπενέμης	Παρουσία ιμιπενέμης	Παρουσία αζτρεονάμης
$K_M$ (μM)	156,4	165	194,2	144,2
$V_{max}$ (μM/min)	240,5	58,86	180,3	208,9

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά συμπεράναμε ότι η μεροπενέμη και η αζτρεονάμη δρουν σαν μη συναγωνιστικοί αναστολείς μειώνοντας την  $V_{max}$  της αντίδρασης, ενώ η ιμιπενέμη δρα ως ένας μικτός αναστολέας επηρεάζοντας περισσότερο την  $V_{max}$ , μειώνοντάς την, και λιγότερο την  $K_M$  του ενζύμου για την πενικιλίνη, αυξάνοντάς την, όπως απεικονίζονται και στο διάγραμμα Lineweaver-Burk (**Εικόνα 47**).



**Εικόνα 47.** Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου, απουσία και παρουσία αναστολέων.

Για την μεροπενέμη και την αζτρεονάμη που δρουν ως μη συναγωνιστικοί αναστολείς υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής σύμφωνα με τον τύπο:

$$V_{\max i}/V_{\max} = K_i/(K_i + [I])$$

Όπου  $V_{\max i}$  είναι η  $V_{\max}$  παρουσία του αναστολέα,  $K_i$  είναι η σταθερά αναστολής και  $[I]$  είναι η συγκέντρωση του αναστολέα. Οι τιμές που βρέθηκαν είναι:

Για την μεροπενέμη:

$$K_i = 3.24 \mu\text{M}$$

Και για την αζτρεονάμη:

$$K_i = 661.1 \mu\text{M}$$



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα εντεροβακτηριακά είναι σημαντικά ευκαιριακά παθογόνα. Την δεκαετία του '80 τα Gram-αρνητικά παθογόνα φάνηκε να καταπολεμούνται από τις οξυΐμινο-κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες και φθοριοκινολόνες. Όμως, σήμερα αυτά τα παθογόνα επέστρεψαν πάλι στο προσκήνιο υποβοηθούμενα από την οργάνωση της μεμβράνης τους, που προωθεί τον αποκλεισμό και την εκροή των αντιβιοτικών, και μία αξιοσημείωτη ικανότητα να προσλαμβάνουν, μεταφέρουν και τροποποιούν την έκφραση γονιδίων αντοχής, συμπεριλαμβανομένων των ESBL και καρβαπενεμασών. Gram-αρνητικά στελέχη τα οποία φέρουν τέτοια γονίδια αντοχής απαντώνται σήμερα με αυξανόμενη συχνότητα.

Οι ESBLs αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη απειλή για τις οξυΐμινο-κεφαλοσπορίνες τρίτης και τέταρτης γενιάς. Οι πρώτες ESBLs ήταν παραλλαγές των πλασμιδιακών TEM και SHV που είχαν εξαπλωθεί σε *E. coli* και άλλα Εντεροβακτηριακά. Παρόλο που οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς είναι σταθερές στα κλασικά TEM και SHV ένζυμα, πάνω από 200 καινούργιες παραλλαγές ESBL έχουν βρεθεί με αλλαγές αλληλουχίας που διευρύνουν το ενεργό σημείο επιτρέποντας την δράση τους ενάντια στις οξυΐμινο-κεφαλοσπορίνες.

Μια μαζική αλλαγή συνέβη στην κατανομή των ESBLs από το 2000 με την εξάπλωση των CTX-Ms. Διαφορετικές οικογένειες CTX-M επικρατούν σε διαφορετικές περιοχές: η CTX-M-15 (ομάδα 1) επικρατεί στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, τη Βόρεια Αμερική, τη Μέση Ανατολή και Ινδία, αλλά η CTX-M-14 (ομάδα 9) είναι πιο συχνή στην Κίνα, τη Νοτιοανατολική Ασία και Ισπανία, και η CTX-M-2 (ομάδα 2) επικρατεί στην Αργεντινή, το Ισραήλ και την Ιαπωνία.

Με σκοπό να δούμε πως αυτή η εικόνα που υπάρχει σε παγκόσμιο επίπεδο αντιπροσωπεύεται στην Ελλάδα ξεκινήσαμε την μελέτη μας σχετικά με την κατανομή και την επικράτηση των γονιδίων αυτών σε στελέχη που συλλέξαμε από διαφορετικά νοσοκομεία τριτοβάθμιας περίθαλψης στον ελληνικό χώρο.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσίασαν ενδιαφέρον. Ο CTX-M-τύπος, ο πιο συχνός παγκοσμίως (Pitout JDD, 2008) και στις κοντινές ευρωπαϊκές χώρες (Cantón R, 2008), βρέθηκε να επικρατεί και στη συλλογή μας. Το CTX-M-15 αλλήλιο ήταν το επικρατέστερο ανάμεσα στα στελέχη *K. pneumoniae*, ενώ το CTX-M-3

αλληλίο επικράτησε ανάμεσα στα στελέχη *E. coli*. Επιπλέον, όλα τα στελέχη *E. cloacae* και τα μισά από τα στελέχη *K. pneumoniae* έφεραν την SHV-5 ESB� σε σχέση με το 9.3 % των στελεχών *E. coli*. Η ποικιλία των ESB�s γονιδίων σε συνδυασμό με τη διαφορετική κατανομή των ESB� τύπων ανάμεσα στα τρία βακτηριακά είδη της μελέτης είχε ως αποτέλεσμα μία ποικιλία προτύπων ευαισθησίας ανάμεσα στα 202 στελέχη. Οι ESB�-θετικές *E. coli* βρέθηκαν να είναι πιο ευαίσθητες στην κεφταζιδίμη απ' ότi οι *K. pneumoniae*, με ένα μεγάλο ποσοστό να έχει πολύ χαμηλές MICs στη κεφταζιδίμη (0.125-0.5μg/ml). Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στην επικράτηση του CTX-M-3 αλληλίου στα στελέχη *E. coli* της συλλογής μας, το οποίο προσδίδει χαμηλότερα επίπεδα αντοχής στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό σε σχέση με τον CTX-M-15 αλληλίο και την επικράτηση της SHV-5 ESB� στα στελέχη *K. pneumoniae* (Pitout JDD, 2008), (Cantón R, 2008). Ως ήταν αναμενόμενο, όλα τα στελέχη *K. pneumoniae*, εκτός από ένα, και όλα τα στελέχη *E. coli* που φέρανε την SHV-5 β-λακταμάση ήταν ανθεκτικά στην κεφταζιδίμη, μια κεφαλοσπορίνη εκτεταμένου φάσματος που θεωρείται από τα καλύτερα υποστρώματα για το ένζυμο αυτό (Pitout JDD, 2008).

Σύμφωνα με τις με τις οδηγίες του CLSI 2010, τα αποτελέσματα ευαισθησίας με τα καινούργια όρια ευαισθησίας θα πρέπει να αναφέρονται ως έχουν, χωρίς να τροποποιούνται, και επιπλέον δεν είναι πλέον απαραίτητο να πραγματοποιούνται έλεγχοι για την επιβεβαίωση του φαινοτύπου ESB�. Ωστόσο, έχουν εκφραστεί ανησυχίες με το ζήτημα αυτό καθώς η θεραπεία με ESCs συχνά έχει αποτύχει σε περιπτώσεις σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από ESB� στελέχη με χαμηλές MICs (Livermore DM, 2012).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μια αυξημένη ευαισθησία κυρίως στην κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη σύμφωνα με τα αναβαθμισμένα όρια ευαισθησίας του 2010 από το CLSI. Περίπου 50 % των ESB�-θετικών στελεχών βρέθηκαν ευαίσθητα στην κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό από αυτά (6.4 %) παρουσίασε ευαισθησία στην κεφοταξίμη. Αυτή η αυξημένη ευαισθησία των εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν ESB�s στις ESCs με την εφαρμογή των ορίων ευαισθησίας του CLSI 2010 έχει παρατηρηθεί και σε άλλες χώρες, κυρίως της Νοτιοανατολικής Ασίας (Ho PL, 2010), (Huang CC, 2012), (Wang P, 2011). Ωστόσο, τα στοιχεία από τις μελέτες αυτές προέρχονταν από ένα νοσοκομείο και συγκεκριμένα

κλινικά υλικά, σε αντίθεση με τη μελέτη μας που περιλάμβανε στελέχη που παρήγαγαν μόνο ESBLs και προέρχονταν από διαφορετικά νοσοκομεία.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποστηρίζουν την ανάγκη για περισσότερες κλινικές μελέτες για να καθοριστεί η χρήση των ESCs για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBLs και είναι ευαίσθητα στις κεφαλοσπορίνες

Μια άλλη κατηγορία ενζύμων που χρήζουν ανησυχίας είναι οι καρβαπενεμάσες. Οι καρβαπενεμάσες τύπου KPC είναι πλέον οι επικρατέστερες καρβαπενεμάσες που εμφανίζονται στα *Εντεροβακτηριακά* (Nordmann P, 2009). Πρώτα εντοπίστηκαν στην Καρολίνα (ΗΠΑ) το 1996 (Yigit H, 2001) και από το 2006 οι KPC *K. pneumoniae* έχουν εξαπλωθεί σε ΗΠΑ (Bradford PA, 2004), (Bratu S, 2005), (Lomaestro, 2006), (Woodford N, 2004), το Ισραήλ (Navon-Venezia S, 2006), την Ελλάδα (Tsakris A, 2008), (Giakkouri P, 2011) και τελευταίως στην Ιταλία, Κίνα, Βραζιλία και πολλές Ευρωπαϊκές χώρες. Η Ελλάδα παρουσιάζει ένα υψηλό ποσοστό (έως και 40%) *K. pneumoniae* από βακτηριαμίες που φέρουν KPC ένζυμα.

Με αφορμή την πρώτη εμφάνιση KPC *K. pneumoniae* στον Ελληνικό χώρο, και παρατηρώντας την ταχεία εξάπλωση του προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε μία ακριβή και εύκολη μέθοδο για την ανίχνευση του ενζύμου αυτού, καθώς και άλλων β-λακταμασών που μπορούν να συνυπάρχουν, τόσο για θεραπευτικούς όσο και για επιδημιολογικούς σκοπούς.

Η αρχική ταυτοποίηση του KPC φαινοτύπου βασίζεται στην μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Επίσης, το ακριβές τεστ ευαισθησίας στην ερταπενέμη μαζί με το τροποποιημένο HODGE τεστ έχουν προταθεί για τον έλεγχο των στελεχών που παράγουν KPC. Ωστόσο στην περιοχή μας όπου η αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να οφείλεται και σε άλλους μηχανισμούς, όπως η παραγωγή των MBLs, τα τεστ αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αυτού του ενζύμου. Έτσι, αναπτύξαμε μια καινούργια μέθοδο χρησιμοποιώντας δισκία βορονικού οξέος και είδαμε ότι ο έλεγχος αυτός μπορεί να είναι θετικός σε στελέχη KPC, παρόλο που δεν παράγουν *ArmC*. Προχωρήσαμε στην αξιολόγηση αυτής της μεθόδου, χρησιμοποιώντας θετικά και αρνητικά στελέχη για την παραγωγή KPC ενζύμου, και διάφορα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Συμπεράναμε ότι ο έλεγχος με το βορονικό οξύ μπορεί με ακρίβεια να ανιχνεύσει στελέχη που παράγουν KPC ανάμεσα σε στελέχη *K. pneumoniae* που εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες, την κεφοξιτίνη ή τις ESCs.

Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, οι δοκιμές με βορονικό οξύ χρησιμοποιώντας δισκία κεφεπίμης ή καρβαπενεμών είναι απλές και έχουν μεγάλη ευαισθησία και μεγάλη ειδικότητα. Επιπλέον, το τεστ αυτό δίνει και κάποιες πληροφορίες για την ταυτόχρονη παραγωγή μιας SHV-τύπου ESB�, καθώς ήταν συνεχώς αρνητικό για στελέχη KPC *K. pneumoniae* που έφεραν και την SHV-12 ESB�. Το τεστ ήταν θετικό για τις KPC *K. pneumoniae* που έφεραν την SHV-11, που έχει μικρή υδρολυτική ικανότητα ενάντια στις ESCs.

Με δεδομένες τις περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές που υπάρχουν για τα στελέχη αυτά, μια ακριβή και εύκολη μέθοδος για την ανίχνευση των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC θα είναι ένα κρίσιμο πρώτο βήμα στον έλεγχο της εξάπλωσης τους.

Τα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC παρουσιάζουν έναν ετερογενή τρόπο ανάπτυξης, με διάσπαρτες ανθεκτικές αποικίες στην ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο μεροπενέμης, κάνοντας δύσκολη την ανίχνευσή τους και την εκτίμηση επιπέδων ευαισθησίας τους. Μελετήσαμε το φαινόμενο αυτό σε 6 στελέχη της συλλογής μας και παρατηρήσαμε ότι τέτοια στελέχη περιέχουν ετερογενείς υποπληθυσμούς που αναπτύσσονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μεροπενέμης οι οποίες πιθανόν να οδηγήσουν σε αποτυχία θεραπείας λοιμώξεων με αυτά τα στελέχη. Ωστόσο, μετά από ανακαλλιέργειες σε μέσο χωρίς αντιβιοτικό οι αποικίες που αναπτύχθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις μεροπενέμης παρουσίασαν MICs παρόμοιες με αυτές των μητρικών στελεχών. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ανάπτυξη των στελεχών KPC-KP σε υψηλές συγκεντρώσεις μεροπενέμης μπορεί να οφείλεται σε προσωρινή υπερέκφραση του γονιδίου *bla*<sub>KPC</sub> στο υψηλό βακτηριακό φορτίο που χρησιμοποιείται στην πληθυσμιακή ανάλυση.

Επιπλέον, η μελέτη έδειξε ότι η μεροπενέμη δεν θανάτωσε ικανοποιητικά *in vitro* τα βακτήρια που παράγουν KPC λόγω των ετερογενών υποπληθυσμών που επιβιώνουν στην παρουσία της. Ο συνδυασμός της μεροπενέμης με τη γενταμικίνη σε συγκέντρωση 1xMIC είχε ως αποτέλεσμα μια γρήγορη και αποτελεσματική θανάτωση των στελεχών, γεγονός που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία λοιμώξεων από φαινομενικά ευαίσθητα στη μεροπενέμη KPC-KP.

Τα στελέχη αυτά KPC-KP μπορούν να χαρακτηριστούν ως ευαίσθητα στη μεροπενέμη με τις πρότυπες μεθόδους αραίωσης σε άγαρ ή μικροαραιώσεων σε ζωμό (λόγω χαμηλότερου ενοφθαλμισμάτων) γι' αυτό η χρήση εύκολα εφαρμόσιμων

φαινοτυπικών μεθόδων σε κλινικά εργαστήρια ή μοριακών μεθόδων σε μεγαλύτερα εργαστήρια, όπως αυτή των δισκίων βορονικού οξέος, είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική ανίχνευση στελεχών KPC-KP.

Ενδιαφέρον παρουσίασε η απομόνωση στελέχους που έφερνε συγχρόνως πολλά γονίδια β-λακταμασών μεταξύ των οποίων και το καινούργιο γονίδιο *bla<sub>VIM-19</sub>*. Σε ελληνικά νοσοκομεία τριτοβάθμιας περίθαλψης στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν MBLs ή και πιο πρόσφατα KPC καρβαπενεμάσες ανακτώνται συχνά από κλινικές λοιμώξεις (Pournaras S, 2009), (Ikonomidis A, 2007). Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο συνδυασμός μιας ισχυρής VIM παραλλαγής μαζί με KPC και τη CTX-M-15 ESBL αδρανοποιεί όλες τις διαθέσιμες β-λακτάμες, μια περαιτέρω εξάπλωση τέτοιων στελεχών ή πλασμιδίων μπορεί να έχει ακόμα πιο σοβαρές συνέπειες στην θεραπεία νοσοκομειακών λοιμώξεων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Alba J, Ishii Y, Thomson K *et al.*** Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 4760-4762.
2. **Alexander C, Rietschel ET.** Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001; 7(3): 167-202.
3. **Alobwede IF, M'Zali H, Livermore D. M *et al.*** CTX-M extended-spectrum beta-lactamase arrives in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51: 470-471.
4. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA *et al.*** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 3389-402.
5. **Ambler RP.** The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289: 321-31.
6. **Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K *et al.*** Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 40-43.
7. **Arthur M, Molinas C, Depardieu F *et al.*** Characterization of Tn1546, a Tn3-transposon related conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM 4147. *J. Bacteriol.* 1993; 175: 117-27.
8. **Bae IK, Lee BH, Hwang HY *et al.*** A novel ceftazidimehydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 315-319.
9. **Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A *et al.*** Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 151-159.
10. **Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W *et al.*** Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50: 393-396.
11. **Barroso H, Freitas-Vieira A, Lito LM *et al.*** Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum b-lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45: 611-616.
12. **Barrow GJ, Feltham RKA.** eds. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria.* Cambridge: Cambridge University Press. 1993: 128-50.
13. **Barthélémy M, Péduzzi J, Bernard H *et al.*** Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992; 1122: 15-22.
14. **Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R *et al.*** Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 509-513.
15. **Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M *et al.*** A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection.* 1992; 20: 158-163.

16. **Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S.** A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. 1990: 18: 294-298.
17. **Bell JM, Turnidge JD, Gales A.** Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-1999). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2002: 42 (3): 193-198.
18. **Bellais S, Aubert D, Naas T et al.** Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000: 44: 1878-1886.
19. **Bentin L.** The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol*. 1991: 180: 167-82.
20. **Bernard H, Tancrede C, Livrelli V et al.** A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J. Antimicrob. Chemother.* 1992: 29: 590-592.
21. **Berrie C.** Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in an Israeli Hospital. *Medical News*. 2007.
22. **Bonnet R, Champs CD, Sirot D et al.** Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999: 43: 2671-2677.
23. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004: 48 (1): 1-14.
24. **Borg MA, Scicluna E, de Kraker M. et al.** Antibiotic resistance in the southeastern Mediterranean-preliminary results from the ARMed project. *Euro Surveillance*. 2006: 11 (7): 164-167.
25. **Bou G, Cartelle M, Tomas V et al.** Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the north-west area of Spain. *J. Clin. Microbiol.* 2002: 40: 4030-4036.
26. **Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ et al.** "Determining incidence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004: 24 (2): 119-124.
27. **Bradford PA.** Extended-spectrum b-lactamases in the 21st century; characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001: 14: 933-951.
28. **Bradford PA, Bratu S, Urban C et al.** Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenemhydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30  $\beta$ -lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* 2004: 39: 55-60.
29. **Bratu S, Landman D, Alam M et al.** Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005: 49: 776-778.
30. **Bratu S, Landman D, Haag R et al.** Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch. Intern. Med.* 2005: 165: 1430-435.
31. **Bratu S, Mooty M, Nichani S et al.** Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005: 49: 3018-3020.
32. **Bratu S, Tolaney P, Karumudi U et al.** Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, N.Y.: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005: 56: 128-132.

33. **Brenner DJ.** *Enterobacteriaceae*. In: Krieg NR, Holt JG, eds Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins. 1984: 1: 408-20.
34. **Brenwald NP, Jevons G, Andrews JM et al.** An outbreak of a CTX-M-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: the importance of using cefpodoxime to detect extended-spectrum beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51: 195-196.
35. **Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A et al.** Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet.* 1987; 2 (8554): 302-306.
36. **Bush K, Singer SB.** Biochemical characteristics of extended broad spectrum  $\beta$ -lactamases. *Infection.* 1989; 17: 429-433.
37. **Bush K, Macalintal C, Rasmussen BA et al.** Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37: 851-858.
38. **Bush K.** Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33: 259-263.
39. **Bush K.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in North America, 1987-2006. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008; 14 (1): 134-143.
40. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39: 1211-1233.
41. **Bush K.**  $\beta$ -Lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin. Microbiol. Rev.* 1988; 1: 109-123.
42. **Bush K.** Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010; 13: 558-564.
43. **Bush K, Freudenberg JS, Sykes RB.** Interaction of aztreonam and related monobactams with  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 22: 414-420.
44. **Bush K, Tanaka SK, Bonner DP et al.** Resistance caused by decreased penetration of  $\beta$ -lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27: 555-560.
45. **Bush K, Jacoby GA.** Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010: 969-976.
46. **Cantón R, Coque TM.** The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology.* 2006; 9: 466-475.
47. **Cantón R, Novais A, Valverde A et al.** Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008; 14 (suppl. 1): 144-153.
48. **Cao V, Lambert T, Courvalin P.** ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 1212-1217.
49. **Carattoli A, Lovari S, Franco A et al.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 833-835.
50. **Carbonne A, Albertini MT, Astagneau P et al.** Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. *Journal of Hospital Infection.* 2002; 52 (2): 107-113.



51. **Cartelle M, Del Mar TM, Molina F *et al.*** High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240–Gly substitution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004: 48: 2308-2313.
52. **Casellas JMC.** South America: a different continent, different ESBLs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1999: 44suppl. A (16).
53. **Chanal C, Sirot D, Romaszko JP *et al.*** Survey of prevalence of extended-spectrum b-lactamases among *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 1996: 38: 127-132.
54. **Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J *et al.*** Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002: 46: 630-637.
55. **Chen Y, Delmas J, Sirot J *et al.*** Atomic resolution structures of CTX-M b-lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *J Mol Biol.* 2005: 348: 349-362.
56. **Chetoui H, Delhalle E, Melin P *et al.*** Epidemiological typing of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility patterns. *Res. Microbiol.* 1999: 150: 265-272.
57. **Chow JW, Satishchandran V, Snyder TA *et al.*** In vitro susceptibilities of aerobic and facultative gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2002 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Surg Infect (Larchmt).* 2005: 6 (4): 439-48.
58. **Cohen J, Powderly WG *et al.*** *Infectious Diseases.* 2004. Second Edition. Vol. Two.
59. **Coque TM, Oliver A, Perez-Diaz JC *et al.*** Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002: 46: 500-510.
60. **Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveillance.* 2008: 13: 47.
61. **Costello AL, Sharma NP, Yang KW *et al.*** X-ray absorption spectroscopy of the zinc-binding sites in the class B2 metallo-β-lactamase ImiS from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Biochemistry.* 2006: 45: 13650-13658.
62. **Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH *et al.*** Molecular relationship among the *salmonellae*. *J. Bacteriol.* 1973: 115: 307-315.
63. **D' Amato RF, Bottone EJ, Amsterdam D.** Substrate profile systems for the identification of bacteria and yeasts by rapid and automated approaches. In: Balows a, Hausler WJ, Herrmann KL, et al., eds *Manual of clinical microbiology.* Washington, Dc: AMS Press. 1991: 128-36.
64. **Danel F, Hall LM, Duke B *et al.*** OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999: 43: 1362-1366.
65. **Danel F, Hall LM, Gur D *et al.*** OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995: 39: 1881-1884.
66. **Danel F, Hall LM, Gur D *et al.*** OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997: 41: 785-790.

67. **Danel F, Hall LM, Gur D et al..** OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 1998; 42: 3117-3122.
68. **Datta N, Kontomichalou P.** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature. 1965; 208:239-241.
69. **De Champs C, Sirot D, Chanal C et al.** A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. The French Study Group. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 3177-3179.
70. **Decousser JW, Poirel L, Nordmann P.** Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45: 3595-3598.
71. **Dhillon RH, Clark J.** ESBLs: A Clear and Present Danger? Crit Care Res Pract. 2012; 2012: 625170.
72. **Di Conza J, Ayala JA, Power P et al.** Novel class 1 integron (InS21) carrying blaCTX-M-2 in *Salmonella enterica* serovar infantis. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 2257-2261.
73. **Doumith M, Dhanji H, Ellington MJ et al.** Characterization of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and their addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK. J Antimicrob Chemother. 2012; 67: 878-885.
74. **Drieux L, Brossier F, Sougakoff W et al.** Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. Clinical Microbiology and Infection. 2008; 14 (suppl. 1): 90-103.
75. **Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SG.** TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection structure and function. J. Antimicrob. Chemother. 1995; 35: 7-22.
76. **Dunny GM, Leonard BAB, Hedberg PJ.** Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. J. Bacteriol. 1995; 177: 871-876.
77. **DuPont HL, Formal SB, Hornick RB et al.** Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med. 1971; 285: 1-9.
78. **Dutour C, Bonnet R, Marchandin H et al.** CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 beta-lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 534-537.
79. **Essack SY, Hall LM, Pillay D et al.** Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001; 45 (1): 88-95.
80. **European Centre for Disease Prevention and Control Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010.** ECDC, Stockholm, Sweden. 2010.
81. **Ewing WH.** Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., New York. N.Y. 1986.
82. **Falagas ME, Karageorgopoulos DE.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms. Journal of Hospital Infection. 2009; 73 (4): 345-354.
83. **Farmer JJ III, Davis BR.** H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 620-625.

84. **Farmer JJ, McWhorter AC, Brenner DJ et al.** The *Salmonella*-Arizona group of *Enterobacteriaceae*: nomenclature, classification and reporting. Clin.Microbiol. Newsl. 1984; 6: 63-66.
85. **Fiett J, Palucha A, Miaczynska B et al.** A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *klebsiellae*. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 1499-1505.
86. **Frère JM, Galleni M, Bush K et al.** Is it necessary to change the classification of  $\beta$ -lactamases? J. Antimicrob. Chemother. 2005; 55: 1051-1053.
87. **Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM et al.** Standard numbering scheme for class B b-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 5: 660-3.
88. **Garau G, García-Sáez I, Bebrone C et al.** Update of the standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48: 2347-2349.
89. **García A, Navarro F, Miro E et al.** Characterization of the highly variable region surrounding the bla<sub>CTX-M-9</sub> gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 819-826.
90. **Garcia-Fernandez A, Villa L, Moodley A et al.** Multilocus sequence typing of IncN plasmids. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 1987-1991.
91. **Gazin M, Paasch F, Goossens H et al.** Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum-  $\beta$ -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. 2012; 50(4): 1140.
92. **Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V et al.** An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 1510-1513.
93. **Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A et al.** Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 1998; 42: 827-832.
94. **Goossens H, Grabein B.** Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2005; 53 (4): 257-264.
95. **Gransden WR, Elykyn SJ, Philips I et al.** Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes. Rev Infect Dis. 1990; 12: 1008-18.
96. **Hakenbeck R, Coyette J.** Resistant penicillin-binding proteins. Cell. Mol. Life Sci. 1998; 54: 332-340.
97. **Hall BG, Barlow M.** Revised Ambler classification of b-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 2005; 55(6): 1050-1.
98. **Hall BG, Barlow M.** Structure-based phylogenies of the serine b-lactamases. J Mol Evol. 2003; 57: 255-60.
99. **Hall BG, Salipante SJ, Barlow M.** The metallo-b-lactamases fall into two distinct phylogenetic groups. J Mol Evol. 2003; 57: 249-54.
100. **Hall LM, Livermore DM, Gur D et al.** OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 1993; 37: 1637-1644.

101. **Hariharan R, Weinstein RA.** *Enterobacteriaceae*. In: Mayhall CG, ed. Hospital epidemiology and infection control. Baltimore: William and Wilkins. 1996: 345-66.
102. **Hawkey PM.** Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 (Suppl. 1): 159-165.
103. **Hernandez Valladares M, Felici A, Weber G et al.** Zn (II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo- $\beta$ -lactamase activity and stability. Biochemistry. 1997; 36: 11534-11541.
104. **Hickman FW, Farmer JJ III.** *Salmonella typhi*: identification, antibiograms, serology, and bacteriophage typin. Am. J. Med. Technol. 1978; 44: 1149-1159.
105. **Hidron AI, Edwards JR, Patel J et al.** Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infection Control and Hospital Epidemiology. 2008; 29 (11): 996-1011.
106. **Ho PL, Chow KH, Lo WU et al.** Effect of applying the new Clinical and Laboratory Standards Institute ceftazidime and ceftriaxone susceptibility breakpoints for *Escherichia coli* in Hong Kong. Int J Antimicrob Agents. 2010; 37: 270-1.
107. **Hornstein M, Sautjeau-Rostoker C, Péduzzi J et al.** Oxacillin-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase involved in resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol. Lett. 1997; 153: 333-339..
108. **Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM et al.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48: 4438-4440.
109. **Huang CC, Chen YS, Toh HS et al.** Impact of revised CLSI breakpoints for susceptibility to third-generation cephalosporins and carbapenems among *Enterobacteriaceae* isolates in the Asia-Pacific region: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2002–2010. Int J Antimicrob Agents. 2012; 40(Suppl. 1): S4-10.
110. **Huletsky A, Knox JR, Levesque RC.** Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling. J. Biol. Chem. 1993; 268: 3690-3697.
111. **Humeniuk C, Arlet G, Gautier V et al.** Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 3045-3049.
112. **Ibuka AS, Ishii Y, Galleni M et al.** Crystal structure of extended-spectrum b-lactamase Toho-1: insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion. Biochemistry. 2003; 42: 10634-10643.
113. **Ikonomidis A, Spanakis N, Poulou A et al.** Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo-b-lactamase and SHV-2a extended-spectrum b-lactamase in a metallo-b-lactamase and SHV-2a extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a conjugative plasmid. Microb Drug Resist. 2007; 13: 221-6.
114. **Ishii Y, Ohno A, Taguchi H et al.** Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39: 2269-2275.

115. **Ishii Y, Kimura S, Alba J et al.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing shiga toxin gene (stx1)-positive *Escherichia coli* O26: H11: a new concern. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 1072-1075.
116. **Jacoby GA.** AmpC  $\beta$ -lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 2009; 22: 161-182.
117. **Jacoby G, Bush K.** <http://www.lahey.org/studies/>.
118. **Jacoby GA, Medeiros AA.** More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 1991; 35: 1697-1704.
119. **Jacoby GA.** Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. Infect. Dis. Clin. N. Am. 1997; 11: 875-887.
120. **Jacoby GA, Munoz-Price LS.** The new  $\beta$ -lactamases. N Engl J Med. 2005; 352: 380-91.
121. **Jann K, Jann B.** The K antigen of *Escherichia coli*. Prog Allergy. 1982; 33: 53-79.
122. **Jaurin B, Grundstrom T.** AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of  $\beta$ -lactamases of the penicillinase type. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78: 4897-901.
123. **Johnson J.** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. [Clin Microbiol Rev. 1991; 4: 80-128.
124. **Kandolo K, and Wauters G.** Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. J. Clin. Microbiol. 1985; 21: 980-982.
125. **Karisik E, Ellington MJ, Pike R et al.** Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15  $\beta$ -lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother. 2006; 58: 665-668.
126. **Kariuki S, Corkill JE, Revathi G et al.** Molecular characterization of a novel plasmid encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001; 45 (7): 2141-2143.
127. **Karmali MA.** Infection by verocytotoxin-producing *Echerichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2: 15-38.
128. **Kauffman F.** The bacteriology of *Enterobacteriaceae*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1966.
129. **Ke W, Bethel CR, Thomson JM et al.** Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A  $\beta$ -lactamases. Biochemistry. 2007; 46:5732-5740.
130. **Khalaf NG, Eletreby MM, Hanson ND.** Characterization of CTX-M ESBLs in *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Cairo, Egypt. BMC Infectious Diseases. 2009; 9: 84.
131. **Kimura S, Ishiguro M, Ishii Y et al.** Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 1454-1460.
132. **Kliebe C, Nies BA, Meyer JF et al.** Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. 1985; 28 (2): 302-307.
133. **Knothe H, Shah P, Krcmery V et al.** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection. 1983; 11 (6): 315-317.
134. **Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley S et al.** The acyl-enzyme mechanism of  $\beta$ -lactamase action. The evidence for class C  $\beta$ -lactamases. Biochemical Journal. 1982; 207 (2): 315-322.

135. **Kojima A, Ishii Y, Ishihara K et al.** Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 3533-3537.
136. **Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K et al.** Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect.* 2010; 76: 70-73.
137. **Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM et al.** Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 902-906.
138. **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al.** Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1584-1590.
139. **Leavit A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I et al.** Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 3026-3029.
140. **Leclercq R, Dutka-Malen S, Brisson-Noel A et al.** Resistance of *enterococci* to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 15: 495-501.
141. **Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD et al.** Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35: 1093-1098.
142. **Levine MM.** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* 1987; 155: 377-89.
143. **Lewis JS, Herrera M, Wickes B et al.** First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007; 51 (11): 4015-4021.
144. **Limbago BM, Rasheed JK, Anderson KF et al.** IMP-Producing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. *Journal of Clinical Microb.* 2011; 49 (12): 4239-4245.
145. **Liu PYF, Gur D, Hall LMC et al.** Survey of the prevalence of extended-spectrum b-lactamases amongst *Klebsiella* spp from intensive care units at the Royal London hospital. *J Antimicrob Chemother.* 1992; 33: 2580-2582.
146. **Livermore DM.** Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis.* 2003; 36 (suppl. 1): S11-23.
147. **Livermore DM, Woodford N.** Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbio.* 2000; 3: 489-495.
148. **Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM et al.** Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 1569—.
149. **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M et al.** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 165-174.
150. **Livermore DM.** Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1987; 6:439-445.
151. **Livermore DM, Hawkey PM.** CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2005; 56 (3): 451-454.
152. **Livermore DM.** Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36: 2046-2048.

153. **Livermore DM.**  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8: 557-584.
154. **Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS et al.** Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50: 2941-2945.
155. **Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W et al.** The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K. pneumoniae to up-state New York. Clin. Infect. Dis. 2006; 43: e26-28.
156. **Low D, Braaten B, van der Woude M.** Fimbriae. In: Neidhard FC, Ingraham JL, Low KB, et al., eds *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Washington DC: ASM Press. 1996: 146-57.
157. **Lugtenberg B, Van Alphen L.** Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta. 1983; 737: 51-115.
158. **Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW.** Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. Microb Ecol. 2010; 60 (4): 708-720.
159. **Ma L, Ishii Y, Chang FY et al.** CTX-M-14, a plasmid-mediated CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 1985-1988.
160. **Mabeck CE, Orskov F, Orskov J.** *Escherichia coli* serotypes and renal involvement in urinary tract infection. Lancet. 1971; 1: 1312-4.
161. **Macnab RM.** Flagella and motility. In: Neidhard FC, Ingraham JL, Low KB, et al. eds *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Washington, DC: ASM Press. 1996: 123-45.
162. **Marchandin H, Carriere C, Sirot D et al.** TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:2069-2073.
163. **Marchiaro P, Ballerini V, Spalding T et al.** A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. J. Antimicrob. Chemother. 2008; 62: 336-344.
164. **Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S et al.** In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiellae pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40: 342-348.
165. **Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T et al.** Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 1988; 32: 1243-1246.
166. **Matthew M, Harris AM, Marshall MJ et al.** The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases. J. Gen. Microbiol. 1975; 88: 169-178.
167. **Matthew M.** Plasmid mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. J. Antimicrob. Chemother. 1979; 5: 349-358.
168. **McCracken GH, Sarff JD, Glode MD et al.** Relationship between *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide antigen and clinical outcome in neonatal meningitis. Lancet. 1974; 2: 246-50.
169. **Melano RG, Davidson RJ, Musgrave HL et al.** Cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Nova Scotia, Canada. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2006; 56 (2): 197-205.

170. **Mercuri PS, Bouillenne F, Boschi L et al.** Biochemical characterization of the FEZ-1 metallo- $\beta$ -lactamase of *Legionella gormanii* ATCC 33297T. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45: 1254-1262.
171. **Mercuri PS, Ishii Y, Ma L et al.** Clonal diversity and metallo- $\beta$ -lactamase production in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Microb. Drug Resist. 2002; 8: 193-200.
172. **Meyer KS, Urban C, Eagan JA et al.** Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. Ann. Intern. Med. 1993; 119: 353-358.
173. **Miriagou V, Tzouveleakis LS, Rossiter S et al.** Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 1297-1300.
174. **Moland ES, Black JA, Hossain A et al.** Discovery of CTX-M-like extended-Spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U.S. states. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 2382-2383.
175. **Moland ES, Hanson ND, Herrera VL et al.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 51: 711-714.
176. **Morosini MI, Canton R, Martinez-Beltran J et al.** New extended spectrum TEM-type  $\beta$ -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39: 458-461.
177. **Mugnier P, Dubrous P, Casin I et al.** Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40: 2488-2493.
178. **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al.** Manual of Clinical Microbiology. 2003 - 8th Edition. vol. 1.
179. **Mushta S, Woodford N, Potz N et al.** Detection of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in the United Kingdom. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 52: 528-529.
180. **Naas T, Nordmann P, Vedel G et al.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49: 4423-4424.
181. **Natarro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Echerichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 142-201.
182. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report data summary from January 1992 through June 2004.** American Journal of Infection Control. 2004; 32 (8): 470-485.
183. **Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A et al.** Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50: 3098-3101.
184. **Nikaido H.** Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr. Opin. Microbiol. 1998; 1: 516-523.
185. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009; 9: 228-236.
186. **Novais A, Cantón R, Valverde A et al.** Dissemination and persistence of bla<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-a, and IncFI Groups. Antimicrobial Agents Chemother. 2006; 50: 2741-2750.



187. **Okeke IN, Nataro JP.** Enteroaggregative *Escherichia coli*. Lancet Infect dis. 2001; 1: 304-13.
188. **Oliver A, Coque TM, Alonso D et al.** CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 1567-1571.
189. **Oliver A, Pérez-Díaz JC, Coque TM et al.** Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45: 616-620.
190. **Oliver DB. Periplasm.** In: **Neidhardt FC, Curtiss R III, Ingraham JL et al., eds.** *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellulae and molecular biology. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press. 1996: 88-103.
191. **Olson AB, Silverman M, Boyd DA et al.** Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum b-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2112-2115.
192. **Orskov F, Orskov I.** *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can J Microbiol. 1992; 38: 699-704.
193. **Orskov I, Orskov F, Birch-Andersen A.** O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. Scand J Infect Dis. 1982; 33: 18-26.
194. **Osborn MJ.** Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. Annual Review of Biochemistry. 1969; 38: 501-538.
195. **Osborn MJ, Gauder JE, Parisi E et al.** Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J Biol Chem. 1972; 247: 3962-72.
196. **Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH.** Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 b-lactamase gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 7378-82.
197. **Pai H, Choi EH, Lee HJ et al.** Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 3747-3749.
198. **Paltzkill T, Thomson KS, Sanders CC et al.** New variant of TEM-10  $\beta$ -lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39: 1199-1200.
199. **Pangon B, Bizet C, Buré A et al.** In vivo selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3  $\beta$ -lactamase. J. Infect. Dis. 1989; 159: 1005-1006.
200. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews. 2005; 18 (4): 657-686.
201. **Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM et al.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 3554-3560.
202. **Paterson DL.** Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Infect Control. 2006; 34 (5 Suppl. 1): S20-S28.
203. **Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA.** Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. 1996; 60: 575-608.
204. **Perilli M, Segatore B, de Massis MR et al.** TEM-72, a new extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 2537-2539.

205. **Petropoulou D, Tzanetou K, Syriopoulou VP et al.** Evaluation of imipenem/imipenem EDTA disk method for detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures. *Microb. Drug Resist.* 2006; 12: 39-43.
206. **Philippon A, Labia R, Jacoby G.** Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33: 1131-1136.
207. **Philippon LN, Naas T, Bouthors AT et al.** OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum betalactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 2188-2195.
208. **Piddock LJ.** Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs.* 1999; 58 (Suppl.2): 11-18.
209. **Pitout JD, Laupland KB.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8: 159-66.
210. **Pitout JD, Hossain A, Hanson ND.** Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 5715-5721.
211. **Pitout JD, Moland ES, Sandes CC et al.** Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 35-9.
212. **Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB et al.** Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2005; 56 (1): 52-59.
213. **Poirel L, Girlich D, Naas T et al.** OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 447-453.
214. **Poirel L, Mammeri H, Nordmann P.** TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type beta-lactamase from *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 4528-4531.
215. **Poirel L, Heritie CR, Tolun V et al.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 15-22.
216. **Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P.** Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50: 1031-1034.
217. **Poirel L, Kampfer P, Nordmann P.** Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 4038-4040.
218. **Poirel L, Naas T, Le Thomas I et al.** CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 3355-3361.
219. **Potron A, Poirel L, Croizé J et al.** Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type  $\beta$ -lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53: 3010-3016.
220. **Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E et al.** Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64 (2): 348-52.

221. **Power P, Galleni M, Di Conza J et al.** Description of In116, the first blaCTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. J Antimicrob Chemother. 2005; 55: 461-465.
222. **Power P, Radice M, Barberis C et al.** Cefotaxime-hydrolysing beta-lactamases in *Morganella morganii*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1999; 18: 743-747.
223. **Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E et al.** Emergence of an inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41: 838-840.
224. **Quale JM, Landman D, Bradford PA et al.** Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. Clin. Infect. Dis. 2002; 35: 834-841.
225. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. Microbiol. Rev. 2007; 20: 440-458.
226. **Queenan AM, Foleo B, Gownley C et al.** Effects of inoculum and  $\beta$ -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 269-275.
227. **Quinn JP, Miyashiro D, Sahm D et al.** Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1989; 33 (9): 1451-1456.
228. **Radice M, Power P, Di Conza J et al.** Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 602-604.
229. **Rasmussen BA, Bush K.** Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41: 223-232.
230. **Rather PN, Orosz E, Shaw KJ et al.** Characterization and transcriptional regulation of the 2'-N-acetyltransferase gene from *Providencia stuartii*. J. Bacteriol. 1993; 175: 6492-6498.
231. **Reinert RR, Low DE, Rossi F et al.** Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007; 60 (5) 1018-1029.
232. **Revees P.** Biosynthesis and assembling of lipopolysaccharides. In: Ghuysen J-M, Hakenbeck R, eds. Bacterial cell wall. New comprehensive biochemistry. 1994; 2: 218-317.
233. **Rice LB, Carias LL.** Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance element from *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. 1998; 180: 714-721.
234. **Rice LB.** Bacterial Monopolists: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in gram-positive bacteria. Clin. Infect. Dis. 2000; 31: 761-769.
235. **Rice LB, Carias LL, Hujer AM et al.** High-level expression of chromosomally encoded SHV-1  $\beta$ -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 362-367.
236. **Rice LB, Carias LL, Hutton-Thomas R et al.** Penicillin binding proteins 5 and expression of ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45: 1480-1486.
237. **Riley G, Toma S.** Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using Congo red-magnesium oxalate agar medium. J. Clin. Microbiol. 1989; 27: 213-214.

238. **Robbins JB, McCracken GH, Gotschlich EC et al.** *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis. *N Engl J Med.* 1974; 280: 1216-20.
239. **Robin F, Delmas J, Chanal C et al.** TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1  $\beta$ -lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 4443-4447.
240. **Rodríguez MM, Power P, Radice M et al.** Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTXM-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 4895-4897.
241. **Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM et al.** Community infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Archives of Internal Medicine.* 2008; 168: 17: 1897-1902.
242. **Romero L, López L, Rodríguez-Baño J et al.** Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum b-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11:625-631.
243. **Rossi F, Baquero F, Hsueh PR et al.** In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58 (1): 205-10.
244. **Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C.** The spread of CTX-M-type extended-spectrum b-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (Suppl. 1): 33-41.
245. **Roy C, Foz A, Segura C et al.** Plasmid-determined  $\beta$ -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1983; 12: 507-510.
246. **Russo TA, Johnson James R.** Diseases Caused by Gram-Negative Enteric Bacilli" (Chapter). *Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: Harrison's Principles of Internal Medicine.* 2008. Chapter 143. 17e.
247. **Ryan KJ, Ray CG.** *Sherris Medical Microbiology.* McGraw Hill. 2004: 4th ed.
248. **Sader HS, Jones RN, Gales AC et al.** SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2004; 8(1): 25-79.
249. **Schaberg DR.** Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections. *Ann. Intern. Med.* 1991; 91(Suppl. 3B): 72S-75S.
250. **Schleifer KH, Kandler O.** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 1972; 36: 407-77.
251. **Schneider I, Queenan AM, Bauernfeind A.** Novel carbapenemhydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 1330-1335.
252. **Segatore B, Massidda O, Satta G et al.** High specificity of cphA-encoded metallo- $\beta$ -lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036 for carbapenems and its contribution to  $\beta$ -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37: 1324-1328.
253. **Sekowska A, Janicka G, Klyszejko C et al.** Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing and not producing ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) type enzymes to selected non-beta-lactam antibiotics. *Medical Science Monitor.* 2002; 8 (3): BR100-BR104.

254. **Shaw KJ, Rather P, Sabatelli F et al.** Characterization of the chromosomal aac(6)-Ic gene from *Serratia marcescens*. Antimicrob. Agents Chemother. 1992; 36: 1447-1455.
255. **Sirost D, Recule C, Chaibi EB et al.** A complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41: 1322-1325.
256. **Sirost D, Sirost J, Labia R et al.** Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 1987; 20: 323-334.
257. **Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G et al.** Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. Rev. Infect. Dis. 1988; 10: 879-884.
258. **Stam WE, Turck M.** Urinary tract infection. Adv Intern Med. 1983; 28: 141-59.
259. **Sturenburg E, Kuhn A, Mack D et al.** A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. J. Antimicrob. Chemother. 2004; 54: 406-409.
260. **Sykes RB, Bush K.** Physiology, biochemistry and inactivation of beta-lactamases, p. 155–207. In R. B. Morin and M. Gorman (ed.), The chemistry and biology of beta-lactam antibiotics. Academic Press. 1982; vol. 3.
261. **Talbot GHZ, Bradley J, Edwards JE et al.** Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2006; 42: 657-68.
262. **Tessier F, Arpin C, Allery A et al.** Molecular characterization of a TEM-21 beta-lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. Antimicrob. Agents Chemother. 1998; 42: 2125-2127.
263. **Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR.** ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? Microbiol Mol Biol Rev. 2006; 70: 296-316.
264. **Toleman MA, Rolston K, Jones RN et al.** Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 2859-2863.
265. **Toth A, Damjanova I, Puskas E et al.** Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010; 29: 765-769.
266. **Tsakris A, Kristo I, Poulou A et al.** First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. J Antimicrob Chemother. 2008; 62(6): 1257-60.
267. **Turner PJ, Greenhalgh JM, Edwards JR et al.** The MYSTIC (meropenem yearly susceptibility test information collection) programme. International Journal of Antimicrobial Agents. 1999; 13(2): 117-125.
268. **Turton JF, Ward ME, Woodford N et al.** The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol. Lett. 2006; 258: 72-77.
269. **Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT et al.** CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int. J. Antimicrob. Agents. 2000; 14: 137-142.

270. **Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP et al.** Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4769-4775.
271. **Van Kregten E, Westerdaal NA, Willer JM.** New, simple medium for selective recovery of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from human feces. *J Clin Microbiol.* 1984; 20: 936-41.
272. **Vatopoulos A.** High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 2008; 13(4): 8023.
273. **Vatopoulos AC, Philippon A, Tzouvelekis LS et al.** Prevalence of a transferable SHV-5 type  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990; 26: 635-648.
274. **Villegas MV, Lolans K, del Rosario OM et al.** First detection of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 226-229.
275. **Villegas MV, Lolans K, Correa A et al.** First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 1553-1555.
276. **Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG et al.** "Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in South America. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008; 14 (1): 154-158.
277. **Wadstrom T, Aust-Kettis A, Habte D et al.** Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stool of Ethiopian children with diarrhoeal disease. *Arch. Dis. Child.* 1976; 51: 865-870.
278. **Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A et al.** Evaluation of a new E-test for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2755-2759.
279. **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Can. J. Microbiol.* 2004; 50:137-165.
280. **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57: 373-383.
281. **Wang H, Kelkar S, Wu W et al.** Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* Producing Extended-Spectrum beta-Lactamases: Prevalence of CTX-M-3 at a Hospital in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 790-793.
282. **Wang P, Hu F, Xiong Z et al.** Susceptibility of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* according to the new CLSI breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 3127-31.
283. **Washington Post.** [http://www.washingtonpost.com/national/health-science/superbug-stalked-nih-hospital-last-yearkillingsix/2012/08/22/5be18b1a-c66-11e1-9ddc-340d5efb1e9c\\_story\\_1.html](http://www.washingtonpost.com/national/health-science/superbug-stalked-nih-hospital-last-yearkillingsix/2012/08/22/5be18b1a-c66-11e1-9ddc-340d5efb1e9c_story_1.html). 2012.
284. **Weber DA, Sanders CC.** Diverse potential of  $\beta$ -lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34: 156-158.
285. **Wei ZQ, Du XX, Yu YS et al.** Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. 51: 763-765.
286. **Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P.** Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 2385-2392.

287. **Wells JG, Davis BR, Wachmuth IK et al.** Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J. Clin. Microbiol. 1983; 18: 512-520.
288. **Wiegand IK, Geiss H, Mack D et al.** Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45 (4): 1167-1174.
289. **Winokur PL, Canton R, Casellas JM et al.** Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clinical Infectious Diseases. 2001; 32 (10, suppl. 2) S94-S103.
290. **Woodford N, Dallow J, Hill R et al.** Presentation at 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, September 2006.
291. **Woodford N, Tierno PM Jr, Young K et al.** Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48: 4793-4799.
292. **Woodford N, Turton JF, Livermore DM.** Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35: 736-755.
293. **Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH et al.** Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamases in gram-negative bacilli. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2004; 49:5-11.
294. **Yan JJ, Ko WC, Tsai SH et al.** Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 4320-4325.
295. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al.** Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 1151-61.
296. **Yigit H, Queenan AM, Rasheed K et al.** Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 3881-3889.
297. **Yong D, Lee K, Yum JH et al.** Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3798-3801.
298. **Yotsuji A, Minami S, Inoue M et al.** Properties of novel  $\beta$ -lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1983; 24: 925-929.
299. **Yu WL, Pfaller MA, Winokur PL et al.** Cefepime MIC as a predictor of the extended-spectrum beta-lactamase type in *Klebsiella pneumoniae*, Taiwan. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8: 522-524.
300. **Yu WL, Winokur PL, Von Stein DL et al.** First description of *Klebsiella pneumoniae* harboring CTX-M beta-lactamases (CTX-M-14 and CTX-M-3) in Taiwan. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 1098-1100.
301. **Yuan M, Aucken H, Hall LM et al.** Epidemiological typing of *Klebsiella* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from European intensive care units. J Antimicrob Chemother. 1998; 41: 527-539.

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>

Short communication

## Susceptibility patterns to extended-spectrum cephalosporins among Enterobacteriaceae harbouring extended-spectrum $\beta$ -lactamases using the updated Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria

Ioulia Kristo<sup>a</sup>, Vassiliki Pitiriga<sup>b</sup>, Aggeliki Poulou<sup>b,c</sup>, Olympia Zarkotou<sup>d</sup>, Maria Kimouli<sup>e</sup>, Spyros Pournaras<sup>a</sup>, Athanassios Tsakris<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece<sup>b</sup> Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece<sup>c</sup> Department of Microbiology, Serres General Hospital, Serres, Greece<sup>d</sup> Department of Microbiology, Tsaneion General Hospital, Piraeus, Greece<sup>e</sup> Department of Microbiology, Saint Panteleimon Hospital, Nicosia, Greece

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 October 2012

Accepted 5 December 2012

## Keywords:

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase  
Extended-spectrum cephalosporins  
CLSI breakpoints

## ABSTRACT

We examined the effect of applying the updated 2010 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) susceptibility breakpoints for extended-spectrum cephalosporins (ESCs) to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. In total, 202 ESBL-producing, plasmidic AmpC- and carbapenemase-negative isolates derived from separate patients were collected from three Greek hospitals during 2007–2011, including 150 *Escherichia coli*, 43 *Klebsiella pneumoniae* and 9 *Enterobacter cloacae* clinical isolates. ESBLs were detected using the ESBL CLSI confirmatory test and PCR assays. Sequencing analysis showed that 91 (45.0%) of the ESBL-producers carried the *bla*<sub>CTX-M-3</sub> gene, 66 (32.7%) carried the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene and the remaining 45 (22.3%) carried the *bla*<sub>SHV-5</sub> gene. Minimum inhibitory concentrations for cefotaxime, ceftazidime and cefepime were determined by the agar dilution method. Based on the new CLSI breakpoints, 13 (6.4%) of the ESBL-producers were susceptible to cefotaxime, 90 (44.6%) to ceftazidime and 112 (55.4%) to cefepime; as many as 145 (71.8%) were susceptible to at least one ESC. Among the 150 *E. coli*, 12 (8.0%), 87 (58.0%) and 79 (52.7%) were susceptible to cefotaxime, ceftazidime and cefepime, respectively, whilst among the 43 *K. pneumoniae*, 1 (2.3%), 3 (7.0%) and 25 (58.1%) were susceptible to the above ESCs, respectively. None of the nine *E. cloacae* were susceptible to cefotaxime and ceftazidime, but all except one were susceptible to cefepime. By implementation of the new 2010 CLSI breakpoints, a considerable proportion of ESBL-possessing Enterobacteriaceae would be reported as susceptible, mostly to ceftazidime and cefepime, leading to possible infection control and therapeutic implications.

© 2013 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

## 1. Introduction

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) have emerged gradually since the mid 1980s in members of the Enterobacteriaceae family [1]. They hydrolyse extended-spectrum cephalosporins (ESCs) with an oxymino side chain but are not active against cephamycins and carbapenems and yet are inhibited by  $\beta$ -lactamase inhibitors. There are various groups of ESBL types, of which the most common in Enterobacteriaceae species are the CTX-M, SHV and TEM types [1]. ESBL-producers are associated with increasing prevalence rates worldwide as well as increased morbidity and mortality, especially

amongst patients in intensive care and high dependency units [1,2]. Consequently, accurate laboratory detection is important to prevent administration of inappropriate antimicrobial therapy.

Clinical failures using ESCs for treatment of infections due to ESBL-producing bacteria with minimum inhibitory concentrations (MICs) within the susceptible range [1,3] led the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) in 2002 to recommend ESBL phenotypic screening for Enterobacteriaceae [4]. When ESBL production is detected, the CLSI recommended that the ESC interpretive results had to be reported as resistant, irrespective of their MIC [4]. However, additional resistance mechanisms and the existence of multiple enzymes in a single isolate [5], which can complicate ESBL detection and confirmation, coupled with the emergence of new pharmacodynamic/pharmacokinetic studies for cephalosporins [6], resulted in revision of the 2010 CLSI

\* Corresponding author. Tel.: +30 210 746 2011; fax: +30 210 746 2210.  
E-mail address: [atsakris@med.uoa.gr](mailto:atsakris@med.uoa.gr) (A. Tsakris).



interpretive criteria [7]. The new breakpoints were applied to several cephalosporins and aztreonam against Enterobacteriaceae. Specifically, the susceptibility breakpoints for cefotaxime, ceftriaxone, cefazolin and ceftizoxime were lowered from 8 µg/mL to 1 µg/mL; similarly, breakpoints for ceftazidime and aztreonam were lowered from 8 µg/mL to 4 µg/mL. No change was required in the interpretive criteria for cefepime and cefuroxime (parenteral), with the susceptibility breakpoints remaining at 8 µg/mL.

Implementation of these new recommendations considerably affects the laboratory reporting and subsequently the selection of antibiotic therapy in clinical practice. Although it has been supported that the new breakpoints will provide improved information for directing patient care and will result in less uncertainty for the clinical laboratory, recent studies from Southeast Asian regions have shown that the revised breakpoints failed to detect several ESBL-producing strains [8–10], possibly leading to a loss of critical infection control information and inappropriate antimicrobial usage [11].

In that respect, it is important to assess the effect of the updated CLSI interpretive criteria on the ESC susceptibility categorisation of the current ESBL-producing isolates. For this reason, we tested the impact of the new CLSI ESC susceptibility breakpoints for genotypically confirmed ESBL-possessing Enterobacteriaceae strains recently isolated from clinical infections in Greek hospitals.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Clinical isolates

During 2007–2011, ESBL-producing and plasmidic AmpC- and carbapenemase-negative Enterobacteriaceae clinical isolates recovered from separate patients were gathered from three Greek hospitals. The collection consisted of 202 bacterial strains, including 150 *Escherichia coli*, 43 *Klebsiella pneumoniae* and 9 *Enterobacter cloacae* clinical isolates. After collection, the isolates were inoculated in brain–heart infusion broth supplemented with 15% glycerol and were stored at –80 °C.

### 2.2. Phenotypic testing

Identification of the study isolates and initial susceptibility testing to various antimicrobial agents were performed using Vitek-2 system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and Microscan system (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). ESBLs were phenotypically detected with the CLSI ESBL confirmatory test using both cefotaxime (30 mg) and ceftazidime (30 mg) discs alone and in combination with clavulanic acid (10 mg) [4].

MIC testing of the most commonly used ESCs in Greek hospitals (cefotaxime, ceftazidime and cefepime) was performed by the agar dilution method according to CLSI guidelines, and results were interpreted according to the revised 2010 CLSI interpretive criteria [7].

### 2.3. PCR assays and DNA sequencing

Phenotypically ESBL-positive isolates were confirmed by PCR assays for CTX-M, SHV, TEM and GES/IBC ESBL genes [12]. PCR amplicons produced using primers amplifying the total ESBL gene were sequenced for characterisation of the specific gene variant [12,13]. PCR products were purified using ExoSAP-IT® reagent (USB Corp., Cleveland, OH) and were used as templates for nucleotide sequencing on both strands using an ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR assays were also used to detect plasmidic AmpC genes in single PCR reactions for each gene as well as carbapenemase genes, including KPC, IMP, VIM, NDM and OXA-48 genes [12]. ESBL-producing clinical

isolates that harboured plasmidic AmpC or carbapenemase genes were excluded from further analysis.

## 3. Results

### 3.1. Distribution of extended-spectrum β-lactamase genes among isolates in the study

During the study period, 202 ESBL-producing, plasmidic AmpC- and carbapenemase-negative Enterobacteriaceae clinical isolates recovered from separate patients were studied. Table 1 shows the distribution of ESBL genotypes and the ESC susceptibility patterns of the study isolates. Molecular testing revealed that among the ESBL-positive isolates, 157 (77.7%) harboured the CTX-M-type and 45 (22.3%) harboured the SHV-type ESBLs. Sequencing analysis showed that 91 (58.0%) of the CTX-M-type-harboring isolates carried the *bla*<sub>CTX-M-3</sub> gene and 66 (42.0%) carried the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene, both belonging to the CTX-M-1 group. All SHV-type-positive isolates were found to carry the *bla*<sub>SHV-5</sub> gene. TEM or GES/IBC types of ESBLs were not detected in any of the isolates.

### 3.2. Distribution of extended-spectrum β-lactamase genes among Enterobacteriaceae species

Among the 150 *E. coli*, 136 (90.7%) were positive for CTX-M-type ESBL and the remaining 14 (9.3%) were positive for SHV-5 ESBL. Of the 136 CTX-M-type *E. coli*, 89 (65.4%) and 47 (34.6%) carried *bla*<sub>CTX-M-3</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> genes, respectively. Among the 43 *K. pneumoniae* isolates, 21 (48.8%) carried a CTX-M-type ESBL and the remaining 22 (51.2%) carried an SHV-5 type. Among the 21 CTX-M-producing isolates, the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was predominant (19 isolates; 90.5%), whilst only 2 isolates (9.5%) harboured the *bla*<sub>CTX-M-3</sub> gene. All 9 isolates of *E. cloacae* carried the *bla*<sub>SHV-5</sub> gene (Table 1).

### 3.3. Minimum inhibitory concentrations of extended-spectrum cephalosporins and susceptibility rates among extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains

Table 2 presents the MICs and MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values (MICs for 50% and 90% of the isolates, respectively) of the ESCs against ESBL-producing strains of the study as well as the susceptibility rates to ESCs by applying the new CLSI criteria. A total of 145 isolates (71.8%) were susceptible to at least one of the tested cephalosporins. Specifically, 13 (6.4%), 90 (44.6%) and 112 (55.4%) isolates were susceptible to cefotaxime, ceftazidime and cefepime, respectively (Table 2).

Of the 43 *K. pneumoniae* isolates, 1 (2.3%), 3 (7.0%) and 25 (58.1%) were susceptible to cefotaxime, ceftazidime and cefepime, respectively, whilst of the 150 *E. coli* isolates, 12 (8.0%), 87 (58.0%) and 79 (52.7%) appeared susceptible to the above ESCs. Notably, among the *E. coli* isolates, as many as 16 isolates had a ceftazidime MIC of ≤0.25 µg/mL and 25 isolates had a ceftazidime MIC of 0.5 µg/mL. In addition, 4 and 3 of the *E. coli* isolates exhibited very low cefepime MICs (0.25 µg/mL and 0.5 µg/mL, respectively; Table 2). Of the *E. cloacae* isolates, none was found susceptible to cefotaxime and ceftazidime, whilst all except one were susceptible to cefepime (MICs of 2–4 µg/mL; Table 2).

### 3.4. Susceptibility profiles among different extended-spectrum β-lactamase types

Regarding the susceptibility profile among different ESBL types, as many as 112 (71.3%) of the 157 CTX-M-type-producing isolates exhibited susceptibility to at least one cephalosporin; 6 (3.8%), 88

Please cite this article in press as: Kristo I, et al. Susceptibility patterns to extended-spectrum cephalosporins among Enterobacteriaceae harbouring extended-spectrum β-lactamases using the updated Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria. Int J Antimicrob Agents (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.003>

Table 1

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genotypes and extended-spectrum cephalosporin (ESC) susceptibility patterns of ESBL-producing Enterobacteriaceae clinical isolates.

Bacterial strain/ESBL genotype (no. of isolates)	No. of isolates with the indicated susceptibility pattern	ESC susceptibility pattern		
		Cefotaxime	Ceftazidime	Cefepime
<i>Escherichia coli</i> (n = 150)				
CTX-M-1 group (136)				
CTX-M-3 (89)	42	R	S	S
	14	R	S	I
	16	R	S	R
	5	R	R	R
	4	S	S	S
	3	R	R	S
	2	R	R	I
	1	R	I	S
	1	R	I	I
	1	R	I	R
CTX-M-15 (47)	13	R	R	R
	10	R	R	S
	10	R	R	I
	7	R	S	S
	3	R	I	I
	2	R	S	I
	1	S	I	S
	1	R	I	S
SHV group (14)				
SHV-5 (14)	3	S	R	S
	3	I	R	S
	3	R	R	R
	2	S	S	S
	2	S	I	S
	1	R	R	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 43)				
CTX-M-1 group (21)				
CTX-M-3 (2)	1	S	R	S
	1	R	S	S
CTX-M-15 (19)	9	R	R	R
	7	R	R	S
	1	R	S	S
	1	R	S	I
	1	R	R	I
SHV group (22)				
SHV-5 (22)	14	R	R	S
	5	R	R	R
	2	R	R	I
	1	R	I	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (n = 9)				
SHV group				
SHV-5 (9)	8	R	R	S
	1	R	R	I

R, resistant; S, susceptible; I, intermediate.

Table 2

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the extended-spectrum cephalosporins (ESCs) against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae isolates and susceptibility rates.

Isolates	ESC	No. of isolates with MIC (μg/mL) of:													MIC (μg/mL)		No. (%) of susceptible isolates
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>		
<i>Escherichia coli</i> (n = 150)	Cefotaxime	0	1	5	6	3	17	20	11	7	44	15	21	64	>256	12 (8.0)	
	Ceftazidime	1	15	25	13	17	16	10	36	12	3	0	2	4	32	87 (58.0)	
	Cefepime	0	4	3	4	2	21	45	33	20	17	0	1	8	64	79 (52.7)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 43)	Cefotaxime	0	1	0	0	0	4	6	7	8	9	4	4	32	128	1 (2.3)	
	Ceftazidime	0	0	1	0	2	0	1	8	7	12	4	8	64	>256	3 (7.0)	
	Cefepime	1	0	0	1	0	6	17	4	7	3	2	2	8	64	25 (58.1)	
<i>Enterobacter cloacae</i> (n = 9)	Cefotaxime	0	0	0	0	0	4	4	1	0	0	0	0	8	16	0	
	Ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	32	64	0	
	Cefepime	0	0	0	0	6	2	0	1	0	0	0	0	2	16	8 (88.9)	
Total ESBL-isolates (n = 202)	Cefotaxime	0	2	5	6	3	25	30	19	15	53	19	25	32	>256	13 (6.4)	
	Ceftazidime	1	15	26	13	19	16	11	47	22	18	4	10	8	64	90 (44.6)	
	Cefepime	1	4	3	5	8	29	62	38	27	20	2	3	8	64	112 (55.4)	

MIC<sub>50/90</sub>, MICs for 50% and 90% of the isolates, respectively.

Please cite this article in press as: Kristo I, et al. Susceptibility patterns to extended-spectrum cephalosporins among Enterobacteriaceae harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases using the updated Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria. Int J Antimicrob Agents (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.003>



(56.1%) and 79 (50.3%) isolates were susceptible to cefotaxime, ceftazidime and cefepime, respectively (Table 1). More specifically, of the 66 isolates harbouring the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene, 1 (1.5%) was susceptible to cefotaxime whilst 11 (16.7%) and 27 (40.9%) were susceptible to ceftazidime and cefepime, respectively. However, among the 91 isolates harbouring the *bla*<sub>CTX-M-3</sub> gene, susceptibility rates to ESCs were considerably greater, with 5 isolates (5.5%) being susceptible to cefotaxime, 77 (84.6%) to ceftazidime and 52 (57.1%) to cefepime (Table 1).

Among the SHV-5-producing isolates, 7 (15.6%) were found to be susceptible to cefotaxime, 2 (4.4%) to ceftazidime and 33 (73.3%) to cefepime.

#### 4. Discussion

It has been recommended that susceptibility results based on the revised lowered CLSI and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints should be reported without being converted in cases of ESBL-producing Enterobacteriaceae [7,11]. However, concerns have been expressed regarding this issue, since treatment with ESCs has often resulted in failure for cases of severe infection caused by low-MIC ESBL-producers [11]. Also, interpretation of isolates with relatively low ESC MICs may vary in the daily routine, depending on the susceptibility testing method and the user, possibly oscillating between susceptibility categories. Thus, it is believed that particularly in cases of infection requiring bactericidal activity, such as bacteraemia or for immunocompromised patients, phenotypic ESBL testing would be needed. In the present study the actual proportion of ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates that would be classified as ESC-susceptible following the updated 2010 CLSI breakpoints was estimated. Approximately one-half of the ESBL-possessing, plasmidic AmpC- and carbapenemase-negative Enterobacteriaceae isolates were found to interpret as susceptible to ceftazidime and cefepime, whilst a considerable proportion of them (6.4%) also exhibited susceptibility to cefotaxime.

CTX-M-type ESBLs, the commonest ESBL types worldwide [1] and in nearly all European countries [14], were also found to predominate in the present collection of ESBL-producing Enterobacteriaceae. The CTX-M-15 type was found to predominate among *K. pneumoniae*, whilst the CTX-M-3 type predominated among *E. coli* isolates. In addition, all 9 *E. cloacae* isolates and approximately one-half of the *K. pneumoniae* isolates carried the SHV-5-type of ESBL compared with 9.3% of *E. coli* isolates. This variety of ESBL genes, combined with the different distribution of the ESBL types among the three bacterial species of the study, resulted in a great variety of ESC susceptibility patterns among the 202 ESBL-possessing pathogens of the present study (Table 1).

ESBL-producing *E. coli* isolates were found to be more susceptible to ceftazidime than *K. pneumoniae* isolates, with a great percentage of them (41/150 isolates; 27.3%) exhibiting very low ceftazidime MICs (0.125–0.5 µg/mL). This observation could be attributed to the prevalence of CTX-M-3 in our *E. coli* collection, which confers considerably lower levels of resistance to ceftazidime in comparison with CTX-M-15 and SHV-5 enzymes [1,13,14], commonly detected in our *K. pneumoniae* bacterial collection. As expected, all but one SHV-5-producing *K. pneumoniae* and ca. 70% of SHV-5-producing *E. coli* isolates of the study exhibited resistance to ceftazidime, an ESC considered as one of the best substrates for this ESBL type [1].

The increased susceptibility of ESBL-producing Enterobacteriaceae to ESCs by applying the 2010 CLSI breakpoints has been recently detected in studies from Southeast Asian countries [8–10]. In particular, a study from Hong Kong [8] has reported that implementation of the new interpretive criteria in current ESBL-positive

*E. coli* isolates results in high susceptibility rates to ceftazidime. In addition, a recent study performed in a single Chinese hospital [10] showed that although all ESBL-producing Enterobacteriaceae were interpreted as ceftazidime-resistant, a substantial number of ESBL-producing *E. coli* and *Proteus mirabilis* isolates were still susceptible to ceftazidime and cefepime by using the new CLSI breakpoints. Lastly, a multicentre study examining susceptibility patterns of Enterobacteriaceae causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region [9] indicated that 40.4% of ESBL-producing *E. coli* and 25.2% of ESBL-producing *K. pneumoniae* were susceptible to ceftazidime, but <2% of them were susceptible to cefotaxime. In accordance with these data, a recent study of 60 genotypically confirmed CTX-M-producing Enterobacteriaceae from a Brazilian tertiary care hospital [15] showed a high proportion of isolates being susceptible to third-generation cephalosporins and aztreonam. However, data from these studies were derived from single hospitals or specific clinical materials, differing from our study that comprised of strains producing exclusively ESBLs and recovered from various clinical samples of different Greek hospitals. It should be also noted that Greece is a country with high endemicity of multidrug-resistant Enterobacteriaceae pathogens and the recognition of strains possessing only ESBLs remains of particular interest in order to implement appropriate infection control measures.

The need for ongoing review and update of ESCs breakpoints is recognised by microbiologists, clinicians and regulators worldwide and decisions should be taken with caution in the absence of adequate data. The results of this study support the need for more clinical studies in order to establish sufficiently the use of ESCs for treating infections caused by cephalosporin-susceptible ESBL-possessing Enterobacteriaceae.

**Funding:** No funding sources.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

#### References

- [1] Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159–66.
- [2] Melzer M, Petersen T. Mortality following bacteraemic infection caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect* 2007;55:254–9.
- [3] Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu I, Klugman KP, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001;39:2206–12.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. Document M100-S19. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- [5] Roberts RJ, Kohn PC, Patel R. Unreliable extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2009;47:358–61.
- [6] Andes D, Craig WA. Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(Suppl. 6):10–17.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- [8] Ho PL, Chow KH, Lo WJ, To KK, Cheng VC. Effect of applying the new Clinical and Laboratory Standards Institute ceftazidime and ceftazoxime susceptibility breakpoints for *Escherichia coli* in Hong Kong. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:270–1.
- [9] Huang CC, Chen YS, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM, et al. Impact of revised CLSI breakpoints for susceptibility to third-generation cephalosporins and carbapenems among Enterobacteriaceae isolates in the Asia-Pacific region: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2002–2010. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40(Suppl. 1):S4–10.
- [10] Wang P, Hu F, Xiong Z, Ye X, Zhu D, Wang YF, et al. Susceptibility of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae according to the new CLSI breakpoints. *J Clin Microbiol* 2011;49:3127–31.
- [11] Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1569–77.

Please cite this article in press as: Kristo I, et al. Susceptibility patterns to extended-spectrum cephalosporins among Enterobacteriaceae harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases using the updated Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria. *Int J Antimicrob Agents* (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.003>

G Model

ANTAGE-4001; No. of Pages 5

## ARTICLE IN PRESS

I. Kristo et al. / International Journal of Antimicrobial Agents xxx (2013) xxx–xxx

5

- [12] Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Politi L, Koumaki V, Spanakis N, et al. Containment of an outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *J Clin Microbiol* 2011;49:3986–9.
- [13] Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, de Massis MR, Bianchi C, Luzzaro F, et al. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from an Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2002;40:611–14.
- [14] Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl. 1):144–53.
- [15] de Oliveira KR, de Freitas AL, Willers DM, Barth AL, Zavascki AP. High frequency of  $\beta$ -lactam susceptibility in CTX-M-type extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* according to the new CLSI recommendations. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2481–3.

Please cite this article in press as: Kristo I, et al. Susceptibility patterns to extended-spectrum cephalosporins among Enterobacteriaceae harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases using the updated Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria. *Int J Antimicrob Agents* (2013); <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.003>



## First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests

Athanassios Tsakris<sup>1\*</sup>, Ioulia Kristo<sup>2</sup>, Aggeliki Poulou<sup>3</sup>, Fani Markou<sup>3</sup>,  
Alexandros Ikonomidis<sup>2</sup> and Spyros Pournaras<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece;

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece;

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Serres General Hospital, Serres, Greece

Received 12 June 2008; returned 20 June 2008; revised 6 August 2008; accepted 7 August 2008

**Objectives:** To investigate the first KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate from a Greek hospital, including phenotypic methods to aid recognition of this resistance type.

**Methods:** A carbapenem-resistant clinical isolate of *K. pneumoniae* was recovered from a hospitalized Greek patient. Detailed susceptibility testing was carried out by the agar dilution method. The isolate was screened by phenotypic and genotypic assays for the presence of various  $\beta$ -lactamases. Boronic acid disc tests were performed to show the ability of these tests to detect production of the KPC enzymes. The potential for conjugal transfer of carbapenem resistance was examined by biparental matings, plasmid analysis and PCR studies.

**Results:** The isolate possessed on the same self-transferable plasmid the KPC-2 carbapenemase and the SHV-12 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. Although the isolate did not produce an AmpC-type enzyme, the production of KPC-2 was associated with positive boronic acid disc tests using cephamycins and cefotaxime as well as ceftazidime and carbapenems as substrates.

**Discussion:** KPC-2-possessing *K. pneumoniae* clinical isolates seem to have been introduced in our region. Boronic acid disc tests using boronic acid in combination with carbapenems or ceftazidime may help the phenotypic detection of KPC enzymes and their distinction from plasmid-mediated AmpC enzymes.

**Keywords:** carbapenemases, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, combined disc test

### Introduction

The plasmid-encoded KPC-type carbapenem-hydrolysing enzymes have emerged among Gram-negative species, particularly *Klebsiella pneumoniae*, in the north-eastern regions of the USA.<sup>1</sup> KPC-producing isolates of multiple Gram-negative species have also been detected in other regions of the USA, as well as in Colombia and China, and in an endemic situation in Israel.<sup>1</sup> Additionally, KPC-possessing *K. pneumoniae* clinical isolates have been recovered from patients hospitalized in French and Swedish hospitals,<sup>2–4</sup> and in two of these cases, the patients were previously hospitalized in Greek intensive care units.<sup>3,4</sup> In this report, we describe the characteristics of a carbapenem-resistant KPC-producing *K. pneumoniae* isolate, which was

recovered from a patient hospitalized in a northern Greek hospital. The use of boronic acid as KPC inhibitor in phenotypic detection tests was also tested.

### Materials and methods

After 8 days of intravenous ampicillin/sulbactam treatment (1.5 g every 8 h), *K. pneumoniae* M410 was repeatedly recovered from urine samples of a young woman hospitalized in Serres General Hospital in 2008. The patient suffered from eclampsia complicated with urinary tract infection. She had delivered by a caesarean section 12 days prior to the bacterial isolation. The isolate was confirmed to be *K. pneumoniae* by using API20E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and displayed resistance to all  $\beta$ -lactams

\*Corresponding author. Tel: +30-210-746-2011; Fax: +30-210-746-2210; E-mail: atsakris@med.uoa.gr



including carbapenems. The isolate remained susceptible to aminoglycosides, tigecycline and colistin, but was resistant to co-trimoxazole and fluoroquinolones. Based on the susceptibility profile, the patient was successfully treated with an aminoglycoside regimen and discharged in a good clinical condition.

Detailed susceptibility analysis was carried out by the agar dilution method following the CLSI guidelines and interpretative criteria.<sup>5</sup> For tigecycline, the US Food and Drug Administration recommendation was used (susceptible,  $\leq 2$  mg/L; and resistant,  $\geq 8$  mg/L), and for colistin, the CLSI recommendation for *Acinetobacter* spp. was used (susceptible,  $\leq 2$  mg/L; and resistant,  $\geq 4$  mg/L). Screening for the presence of a carbapenemase was performed with the modified Hodge test using *Escherichia coli* ATCC 25922 as the indicator strain and 10  $\mu$ g imipenem discs.<sup>6</sup> The MBL Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden), where MBL stands for metallo- $\beta$ -lactamase, and the combined disc test with imipenem and EDTA, performed in Mueller-Hinton agar plates, were used to screen for the production of class B carbapenemases. The presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) was tested with the CLSI confirmatory test and a modified test, which uses clavulanate in combination with boronic acid.<sup>7</sup> The presence of AmpC  $\beta$ -lactamase was phenotypically tested by determining cefoxitin and imipenem MICs in agar with and without 200 mg/L cloxacillin<sup>8</sup> and by using the AmpC detection Etest strips (AB Biodisk), which contain cefotetan with or without cloxacillin.

Boronic acid disc tests were performed to show the ability of these tests to detect production of the KPC enzyme. Discs containing boronic acid were prepared in-house, as recommended previously.<sup>9</sup> The tests were performed by inoculating Mueller-Hinton agar by the standard diffusion method and placing discs containing different  $\beta$ -lactams (imipenem, meropenem, ertapenem, cefepime, cefoxitin, cefotetan, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam) with or without 400  $\mu$ g boronic acid onto the agar. The test was considered positive when the zone diameter around the disc containing the antibiotic substrate and boronic acid was  $\geq 5$  mm than the zone diameter around the disc containing the antibiotic substrate alone.

Isoelectric focusing was performed on a polyacrylamide gel [ampholytes (pH 3–10)].  $\beta$ -Lactamase genes were amplified using a panel of primers to detect all types of MBLs,<sup>10</sup> KPCs,<sup>11</sup> plasmid-mediated AmpCs in single PCR reactions for each gene,<sup>12</sup> OXA carbapenemases,<sup>8</sup> ESBLs<sup>10</sup> and TEM<sup>10</sup> enzymes. The primers for KPC are located from nucleotide positions –39 to +68 of the total, 882 bp, *bla<sub>KPC</sub>* gene (GenBank EU176014) and produce a 989 bp amplicon. In all reactions, previously characterized isolates from our collection carrying all types of  $\beta$ -lactamases tested were used as positive controls. PCR products were purified using the ExoSAP-IT reagent (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) and used as templates for sequencing on both strands with an ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The potential for conjugal transfer of carbapenem resistance was examined in biparental matings using *E. coli* 26R793 (Lac<sup>–</sup> Rif<sup>r</sup>) as the recipient strain. Donor and recipient cells were mixed in a ratio of 1:5, and transconjugants were selected on MacConkey agar plates containing 100 mg/L rifampicin and ertapenem at concentrations of 0.5–2 mg/L. Plasmid extraction on the clinical isolate and transconjugant was performed by using an alkaline lysis protocol and the QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and the *E. coli* strain 39R861 that harbours plasmids of ~147, 63, 35.8 and 6.9 kb as a control.

## Results

The MICs of a variety of  $\beta$ -lactam agents tested against *K. pneumoniae* M410 are shown in Table 1. The isolate was

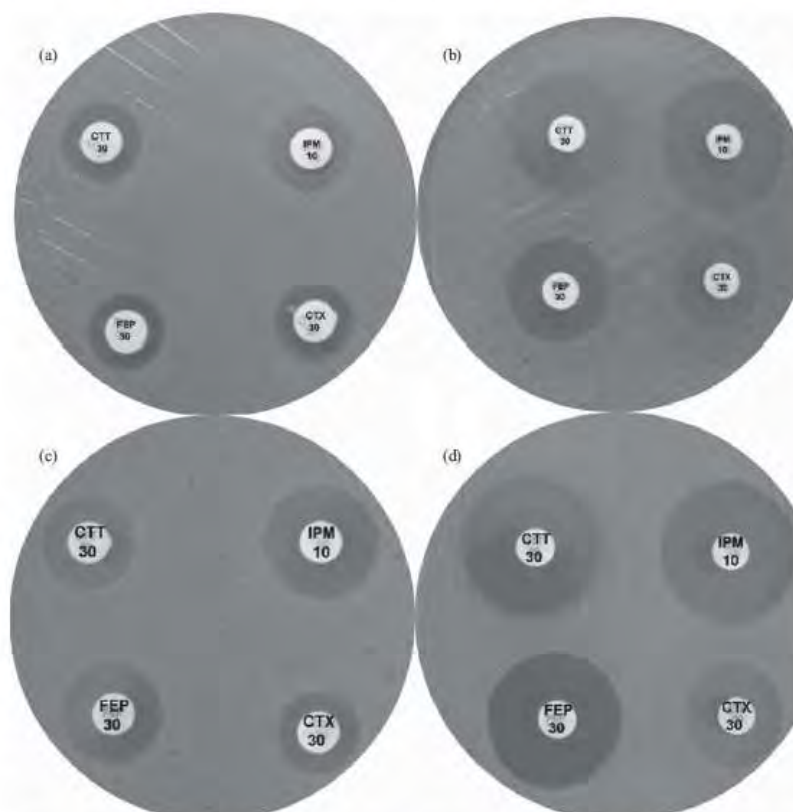
**Table 1.** Agar dilution MICs (mg/L) of  $\beta$ -lactams for *K. pneumoniae* M410, the transconjugant strain and the recipient strain *E. coli* 26R793

Antibiotic <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i> M410	Tc <i>E. coli</i> 26R793 (pM410)	<i>E. coli</i> 26R793
Imipenem	32	16	0.5
Meropenem	32	16	0.03
Ertapenem	64	32	0.06
Aztreonam	>256	256	0.12
Cefotaxime	128	32	0.12
Cefepime	64	32	0.12
Ceftazidime	>256	>256	1
Cefoxitin	64	16	4
Amoxicillin	>256	>256	4
Amoxicillin + CLA	128	64	4
Piperacillin	>256	>256	2
Piperacillin + TZB	>256	128	1

<sup>a</sup>CLA, clavulanic acid at a fixed concentration of 2 mg/L; TZB, tazobactam at a fixed concentration of 4 mg/L.

resistant to all carbapenems (imipenem, meropenem and ertapenem MICs of 32, 32 and 64 mg/L, respectively) as well as to various penicillins,  $\beta$ -lactam/inhibitor combinations, extended-spectrum cephalosporins and aztreonam. It also showed resistance to ciprofloxacin (MIC, 64 mg/L) and trimethoprim (MIC, >256 mg/L), but not to colistin (MIC, 1 mg/L), tigecycline (MIC, 2 mg/L), gentamicin (MIC, 2 mg/L) and amikacin (MIC, 16 mg/L). The application of the modified Hodge test showed the production of a carbapenemase, but the MBL Etest and the combined disc test were negative for the production of class B carbapenemases. Phenotypic testing for ESBL production by the CLSI confirmatory test gave a positive result only for ceftazidime. However, the application of the CLSI confirmatory test in the presence of clavulanate and boronic acid was positive for both compounds (ceftazidime and cefotaxime), clearly indicating the production of an ESBL. Inhibition with cloxacillin did not change imipenem and cefoxitin MICs, and the AmpC detection Etest assay was negative, suggesting the absence of a plasmid-mediated AmpC.

Isoelectric focusing revealed  $\beta$ -lactamases with pI values of 5.4, 6.8 and 8.2 as well as of 7.5, which could be the species-specific chromosomal  $\beta$ -lactamase of *K. pneumoniae*. In accordance with these results, amplification of  $\beta$ -lactamase genes followed by sequencing revealed the presence of *bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>KPC-2</sub>* and *bla<sub>SHV-12</sub>* genes. Analytical PCR testing for all known plasmid-mediated AmpC enzymes was consistently negative. It is of note that although an AmpC-type enzyme was not revealed by molecular assays, phenotypic testing or isoelectric focusing, the disc-based screening assays were positive using boronic acid as an inhibitor and different  $\beta$ -lactams as the antibiotic substrate. These assays showed  $\geq 5$  mm increases in the zone diameters of the combined discs compared with those for cefotetan, cefoxitin or cefotaxime alone. Boronic acid also enhanced remarkably (>8 mm) the activity of cefepime and all carbapenems (imipenem, meropenem and ertapenem), which indicated an inhibitor activity of boronic acid against the KPC enzyme (Figure 1a and b).

KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Greece

**Figure 1.** Representative results using the boronic acid-based method without (a and c) and with (b and d) boronic acid for *K. pneumoniae* M410 and transconjugant 26R793 (pM410), respectively. Four discs are shown in each panel. CTT, cefotetan; IPM, imipenem; FEP, ceftazidime; CTX, cefotaxime.

However, the inhibitor did not affect the activity of ceftazidime or aztreonam, most likely due to the presence of the SHV-type ESBL, which is not affected by boronic acid.

Plasmid analysis and conjugation experiments showed that the M410 clinical isolate contained two plasmids of ~70 and 20 kb and that both *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub> genes were co-transferred along with resistance to trimethoprim on the largest (70 kb) plasmid. *E. coli* transconjugant MICs of  $\beta$ -lactam agents were similar to those for M410, except for those of cefoxitin, cefotaxime and piperacillin/tazobactam, which were lower than those for the parental strain (Table 1). Isoelectric focusing of the transconjugant 26R793 (pM410) revealed  $\beta$ -lactamases with pI values of 6.8 and 8.2, which was consistent with the acquisition of KPC-2 and SHV-12 enzymes, respectively. The application of boronic acid disc tests on the *E. coli* transconjugant also showed positive results for cefotetan, ceftazidime and cefotaxime as well as for all carbapenems and ceftazidime (Figure 1c and d). When the 70 kb plasmid band of 26R793 (pM410) was extracted from the gel and used as a template for the amplification of *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes, the specific 989 bp

and 1014 bp products were detected, respectively, suggesting that both resistance determinants were carried on this plasmid.

## Discussion

Carbapenem resistance is one of the major threats for the antimicrobial treatment of Gram-negative infections. In our regions, carbapenem resistance has emerged among *K. pneumoniae* clinical isolates and is mostly attributed to the production of class B MBLs.<sup>10</sup> This is the first report describing carbapenem resistance due to a KPC-type carbapenemase detected in our hospital settings. The present isolate, similarly to cases described in the USA,<sup>13</sup> also possessed the SHV-12 and TEM-1 enzymes, which contributed to the  $\beta$ -lactam-resistant phenotype. It is of note that phenotypic testing for ESBL production using clavulanate in combination with boronic acid enhanced the detection of ESBL in the KPC-producing isolate, similarly to previous observations for AmpC producers.<sup>7</sup>

KPC-type-producing Enterobacteriaceae are becoming established in several regions, and accurate detection methods for



Tsakris *et al.*

these enzymes as well as for other coexisting  $\beta$ -lactamases are urgently required for both therapeutic and epidemiological purposes.<sup>1,6,13</sup> The early identification of KPC phenotypes often relies on indirect indicators such as reduced susceptibility to carbapenems.<sup>11</sup> Also, accurate ertapenem susceptibility testing along with the modified Hodge test have been suggested for screening KPC-producing isolates.<sup>6</sup> However, in our regions where carbapenem resistance might also be caused by other resistance mechanisms, such as production of MBLs, these tests cannot be used as markers of KPC enzymes. A previous study gave an indication that class A carbapenemase-possessing isolates may be wrongly inferred to have AmpC enzymes using the chromogenic Cica- $\beta$ -Test, which examines the hydrolysis of a chromogenic oxymino-cephalosporin substrate in the presence of boronic acid.<sup>14</sup> In accordance with this observation, our case illustrates that screening for AmpC production with boronic acid discs may be positive among KPC-possessing *K. pneumoniae* isolates, although they did not produce a plasmid-mediated AmpC enzyme. It is also suggested that boronic acid assays using cefepime or carbapenem discs may be used in clinical laboratories to differentiate KPC producers. Further studies are required to evaluate the potential use of boronic acid for the phenotypic detection of KPC-possessing enterobacterial isolates as well as the interpretative guidelines for the accurate detection of plasmid-mediated AmpCs among clinical isolates with KPC enzymes.

## Funding

No specific funding was received for this study.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

1. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 440–58.
2. Naas T, Nordmann P, Vedel G *et al.* Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4423–4.
3. Tegmark Wisell K, Haeggman S, Gezelius L *et al.* Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden. *Euro Surveill* 2007; **12**: E071220.3.
4. Cuzon G, Naas T, Demachy MC *et al.* Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 796–7.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Seventh Edition: Approved Standard M7-A7*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2006.
6. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 2723–5.
7. Song W, Bae IK, Lee YN *et al.* Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by using boronic acid as an AmpC  $\beta$ -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 1180–4.
8. Pourmaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A *et al.* Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 557–61.
9. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4163–7.
10. Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I *et al.* Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a bla<sub>VIM-1</sub> metallo- $\beta$ -lactamase gene. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5344–7.
11. Moland ES, Hanson ND, Herrera VL *et al.* Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 711–4.
12. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2153–62.
13. Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W *et al.* The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: e26–8.
14. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S. Evaluation of the chromogenic Cica- $\beta$ -Test for detecting extended-spectrum, AmpC and metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 1375–9.

## Evaluation of Boronic Acid Disk Tests for Differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the Clinical Laboratory<sup>†</sup>

Athanassios Tsakris,<sup>1\*</sup> Ioulia Kristo,<sup>2</sup> Aggeliki Poulou,<sup>3</sup> Katerina Themeli-Digalaki,<sup>4</sup> Alexandros Ikonomidis,<sup>2</sup> Dimitra Petropoulou,<sup>5</sup> Spyros Pournaras,<sup>2</sup> and Danaï Sofianou<sup>6</sup>

Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens,<sup>1</sup> Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa,<sup>2</sup> Department of Microbiology, Serres General Hospital, Serres,<sup>3</sup> Department of Microbiology, Tzaneion General Hospital, Piraeus,<sup>4</sup> Department of Microbiology, Saint Panteleimon General Hospital, Nicaea,<sup>5</sup> and Department of Microbiology, Hippokraton University Hospital, Thessaloniki,<sup>6</sup> Greece

Received 5 October 2008/Returned for modification 17 November 2008/Accepted 4 December 2008

The worldwide increase in the occurrence and dissemination of KPC  $\beta$ -lactamases among gram-negative pathogens makes critical the early detection of these enzymes. Boronic acid disk tests using different antibiotic substrates were evaluated for detection of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates. A total of 57 genotypically confirmed KPC-possessing *K. pneumoniae* isolates with varying carbapenem MICs were examined. To measure the specificity of the tests, 106 non-KPC-possessing isolates (89 *K. pneumoniae* and 17 *Escherichia coli* isolates) were randomly selected among those exhibiting reduced susceptibility to cefoxitin, expanded-spectrum cephalosporins, or carbapenems. As many as 56, 53, and 40 of the non-KPC-possessing isolates harbored extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, metallo- $\beta$ -lactamases, and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases, respectively. By use of CLSI methodology and disks containing imipenem, meropenem, or ceftazidime, either alone or in combination with 400  $\mu$ g of boronic acid, all 57 KPC producers gave positive results (sensitivity, 100%) whereas all 106 non-KPC producers were negative (specificity, 100%). The meropenem duplicate disk with or without boronic acid demonstrated the largest differences in inhibition zone diameters between KPC producers and non-KPC producers. By use of disks containing ceftazidime, all isolates were correctly differentiated except for five AmpC producers that gave false-positive results (sensitivity, 100%; specificity, 95.3%). These practical and simple boronic acid disk tests promise to be very helpful for the accurate differentiation of KPC-possessing *K. pneumoniae* isolates, even in regions where different broad-spectrum  $\beta$ -lactamases are widespread.

Carbapenem resistance is one of the major threats to the antimicrobial treatment of infections with gram-negative organisms. In the past, it was distinctly unusual among *Klebsiella pneumoniae* isolates and was attributed mostly to porin loss in combination with an AmpC-type enzyme or extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) (5, 8). In recent years, however, carbapenem resistance has emerged among *K. pneumoniae* isolates in many geographical locations due to the acquisition of carbapenemases, which usually belong to Ambler class B metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) or to Ambler class A KPC-type enzymes (25). MBLs have emerged among *K. pneumoniae* isolates in the Far East and southern Europe, while KPC-type enzymes spread first in the northeastern regions of United States and thereafter in several other regions (3, 18, 25).

Phenotypic detection of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates is critical for limiting the spread of the underlying resistance mechanisms (4, 18). In the clinical laboratory, MBL-producing *K. pneumoniae* isolates can be confidently predicted by using several double-disk synergy tests and a combined-disk test with imipenem and EDTA, which accurately identifies MBLs even among carbapenem-susceptible bacterial populations (10). However, detection of KPC-possessing *K.*

*pneumoniae* still remains a challenging issue, and the strategies for laboratory identification of this resistance need to be reviewed and adjusted, because this mechanism is spreading further (1). In regions where KPC enzymes prevail among non-carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* isolates, the accurate determination of levels of susceptibility to ertapenem and the modified Hodge test have been proposed to be sufficiently sensitive methods for the detection of these enzymes (1, 4). Nevertheless, assays that combine high sensitivity and high specificity in the detection of these enzymes do not exist. Tests with such characteristics are particularly needed in regions where MBLs or other resistance determinants are frequently detected among *K. pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to carbapenems. In Greek hospitals, MBL-producing *K. pneumoniae* clinical isolates are endemic (12, 24), but recently the first KPC-possessing *K. pneumoniae* isolate has also been described (28). The latter isolate was phenotypically identified as a KPC producer by using boronic acid disk tests, and this prompted our laboratory to propose a sensitive but also highly specific phenotypic scheme based on the inhibitory effects of boronic acid. We report the evaluation of boronic acid tests using different antibiotic substrates for the phenotypic detection of KPC-possessing *K. pneumoniae* clinical isolates.

### MATERIALS AND METHODS

**Clinical isolates.** The boronic acid disk tests for the detection of KPC were evaluated with 57 genotypically confirmed KPC-possessing *K. pneumoniae* iso-

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, 11527 Athens, Greece. Phone: 30 210 7462011. Fax: 30 210 7462210. E-mail: atsakris@med.uoa.gr.

<sup>†</sup> Published ahead of print on 10 December 2008.



lates. The isolates were recovered from separate patients who were hospitalized in five tertiary-care hospitals located in four distinct Greek regions (two hospitals in the broad region of Athens and one hospital each in Thessaloniki, Larissa, and Serres). The presence of *bla<sub>KPC</sub>* was determined using previously described oligonucleotide primers and cycling conditions (19). Reverse transcription-PCR using these primers and a previously described protocol (22) was performed to demonstrate the activity of the KPC enzyme. To measure the specificity of methods to detect KPC-mediated resistance, 89 *K. pneumoniae* isolates were chosen for testing. All 89 isolates were negative for *bla<sub>KPC</sub>* by PCR. Non-KPC-producing isolates were randomly selected from isolates that were considered to have reduced susceptibility to either cefotaxim (MIC,  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$ ), expanded-spectrum cephalosporins (cefotaxime or ceftazidime; MIC,  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$ ), or carbapenems (imipenem or meropenem; MIC,  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ). In addition, 17 KPC-negative *Escherichia coli* isolates with the same characteristics were included. These 106 isolates possessed a variety of plasmid-mediated AmpC types, ESBLs, and MBLs and came from collections held at the clinical laboratories providing the KPC-positive isolates for the present study. The identification of all isolates was confirmed by using the API 20E system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

**Antimicrobial susceptibility testing and phenotypic screening.** Detailed susceptibility analysis was carried out by the agar dilution method according to CLSI guidelines and interpretative criteria (6). For tigecycline, the U.S. Food and Drug Administration recommendation was used (susceptibility, MIC of  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ; resistance, MIC of  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$ ), and for colistin, the CLSI recommendation for *Acinetobacter* spp. was used (susceptibility, MIC of  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ; resistance, MIC of  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ). Screening for the presence of a carbapenemase was performed with the modified Hodge test (16). The MBL Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) and the combined-disk test with imipenem and EDTA (10) were used to screen for the production of class B carbapenemases. ESBL production was tested using the CLSI confirmatory test and a modification, which uses clavulanate in combination with boronic acid (26). Isolates were phenotypically tested for the presence of AmpC  $\beta$ -lactamase by determining cefoxitin and imipenem MICs in agar with and without 200  $\mu\text{g/ml}$  cloxacillin (23) and by using the AmpC detection Etest strips (AB Biodisk), which contain cefotetan with or without cloxacillin.

**Molecular testing for  $\beta$ -lactamase genes.**  $\beta$ -Lactamase genes were amplified by using a panel of primers for the detection of all types of MBLs (12), KPCs (19), plasmid-mediated AmpC enzymes (with single PCRs for each gene) (21), and ESBLs, including SHV, TEM, CTX-M, and GES/IBC enzymes (29). The primers for KPC are located from nucleotide positions -39 to +68 of the total, 882-bp *bla<sub>KPC</sub>* gene (GenBank accession no. EU176014) and produce a 989-bp amplicon. As positive controls we used previously characterized isolates from our collection carrying all types of tested  $\beta$ -lactamases. In some isolates, PCR products were purified using ExoSAP-IT reagent (USB Corporation, Cleveland, OH) and used as templates for sequencing on both strands with an ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

**Boronic acid disk tests.** The phenotypic detection of KPC-producing *K. pneumoniae* isolates was evaluated with boronic acid disk tests. The stock solution was prepared as previously recommended (7) by dissolving phenylboronic acid (benzeneboronic acid; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in dimethyl sulfoxide at a concentration of 20 mg/ml. From this solution, 20  $\mu\text{l}$  (containing 400  $\mu\text{g}$  of boronic acid) was dispensed onto commercially available antibiotic disks. The disks were then dried and used within 60 min. The tests were performed by inoculating Mueller-Hinton agar by the standard diffusion method (6) and placing disks containing eight different  $\beta$ -lactams (imipenem, meropenem, ertapenem, cefepime, cefoxitin, cefotetan, cefotaxime, and ceftazidime) with or without boronic acid onto the agar. The agar plates were incubated at 37°C overnight. The diameter of the growth-inhibitory zone around a  $\beta$ -lactam disk with boronic acid was compared with that around the corresponding  $\beta$ -lactam disk without boronic acid. The test was considered positive for the detection of KPC enzyme production when the diameter of the growth-inhibitory zone around a  $\beta$ -lactam disk with boronic acid was  $\geq 5$  mm larger than that around a disk containing the  $\beta$ -lactam substrate alone. It should be noted that the concentration of boronic acid employed in the present study did not show any detectable effect on bacterial growth, since the boronic acid MIC exceeded 2,500  $\mu\text{g/ml}$ .

**Sensitivity and specificity.** The performances of the various boronic acid disk tests for the detection of KPC enzymes were evaluated using PCR as the "gold standard." For each test, sensitivity was calculated from the number of KPC-producing organisms that were correctly determined, while specificity was calculated from the number of non-KPC-producing organisms that were correctly determined.

## RESULTS

**Clinical isolates.** Of the 57 KPC-producing *K. pneumoniae* isolates, 19 were from blood (33.3%), 18 from wound swabs (31.6%), 11 from urine (19.3%), 6 from respiratory tract specimens (10.5%), and 3 from vascular catheter tips (5.3%). Of the 106 non-KPC-producing isolates, 32 were from blood (30.2%), 29 from urine (27.4%), 21 from respiratory tract specimens (19.8%), 19 from wound swabs (17.9%), 4 from vascular catheter tips (3.8%), and 1 from cerebrospinal fluid (0.9%).

**Antimicrobial susceptibilities.** Carbapenem MICs differed substantially among the 57 KPC-positive isolates, ranging from 4 to 64  $\mu\text{g/ml}$ , 2 to 64  $\mu\text{g/ml}$ , and 4 to  $>128$   $\mu\text{g/ml}$  for imipenem, meropenem, and ertapenem, respectively. Ten of the KPC producers were susceptible to meropenem (MICs, 2 to 4  $\mu\text{g/ml}$ ), susceptible or intermediate to imipenem (MICs, 4 to 8  $\mu\text{g/ml}$ ), and intermediate or resistant to ertapenem (MICs, 4 to 16  $\mu\text{g/ml}$ ), while the remaining 47 isolates were either intermediate or resistant to all three carbapenems (Table 1). All KPC-positive isolates exhibited resistance to penicillins (ampicillin and piperacillin),  $\beta$ -lactam-inhibitor combinations (amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam), cefoxitin, expanded-spectrum cephalosporins (cefazidime, cefotaxime, cefepime), and aztreonam. Additionally, all KPC producers showed resistance to ciprofloxacin, while 51 showed resistance to trimethoprim, 23 to amikacin, 6 to colistin, and 4 to gentamicin, but none were resistant to tigecycline (MICs, 0.5 to 2  $\mu\text{g/ml}$ ).

Among the 106 KPC-negative isolates, 61 were nonsusceptible (imipenem and meropenem MICs,  $>4$   $\mu\text{g/ml}$ ; ertapenem MIC,  $>2$   $\mu\text{g/ml}$ ) to at least one of the three carbapenems (Table 1). Additionally, as many as 93, 100, and 99 were nonsusceptible (MIC,  $>8$   $\mu\text{g/ml}$ ) to cefoxitin, ceftazidime, and cefotaxime, respectively.

**Phenotypic and molecular screening.** All 57 KPC-positive isolates had positive results by the modified Hodge test, and reverse transcription-PCR experiments confirmed the expression of the KPC gene in all of them. Sequencing results for 10 randomly selected isolates identified the KPC-2 variant of the gene. Phenotypic testing for ESBL production in combination with molecular testing revealed that as many as 48 of the 57 KPC-bearing isolates were also ESBL producers. In all of these cases, an SHV-type ESBL was detected. Sequencing analysis was performed for all these amplicons; it detected SHV-11 in 2 cases and SHV-12 in the remaining 46 cases. PCR testing for other groups of ESBL genes (CTX-M, TEM, GES/IBC), as well as for MBL genes and all known clusters of plasmid-mediated AmpC genes, was consistently negative. In accordance with the latter results, all isolates gave negative results on the phenotypic tests for MBL detection and the cloxacillin inhibition tests, further indicating the absence of MBLs and plasmid-mediated AmpC enzymes. It is also noteworthy that 26 of the 57 KPC producers harbored the TEM-1  $\beta$ -lactamase.

Molecular testing in combination with phenotypic testing of the 106 non-KPC-producing isolates showed that 53 harbored VIM-type MBLs, 56 harbored ESBLs (33 harbored SHV-type ESBLs, 19 harbored CTX-M-type ESBLs, 2 harbored SHV- and TEM-type ESBLs, and 2 harbored GES/IBC-type ESBLs), and 40 harbored AmpC  $\beta$ -lactamases, which belonged to two

TABLE 1. Distribution of carbapenem MICs for the 57 KPC-possessing and the 106 non-KPC-possessing clinical isolates in this study

Characteristic of strain group (by PCR-confirmed $\beta$ -lactamase content) and antimicrobial	No. of isolates with a MIC ( $\mu$ g/ml) of:								
	<1	1	2	4	8	16	32	64	128
KPC and KPC/ESBL positive ( $n = 57$ )									
Imipenem				9	10	14	18	6	
Meropenem			2	8	11	13	15	8	
Ertapenem				1	10	13	17	11	3
VIM and VIM/ESBL positive ( $n = 53$ )									
Imipenem				3	8	14	19	7	2
Meropenem			2	4	12	18	13	4	
Ertapenem				2	11	10	15	12	3
AmpC and AmpC/ESBL positive ( $n = 40$ )									
Imipenem	22	11	2	3	2				
Meropenem	29	8	3						
Ertapenem	24	5	3	1	1	3	3		
ESBL positive ( $n = 13$ )									
Imipenem	9	4							
Meropenem	12	1							
Ertapenem	10	3							

of the six plasmid-mediated AmpC enzyme clusters (24 belonged to the cluster comprising MOX-1, MOX-2, CMY-1, and CMY-8 to CMY-11, and 16 belonged to the cluster comprising LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, and BIL-1).

**Boronic acid disk tests.** Detailed results of the boronic acid disk tests are shown in Table 2, while their sensitivities, specificities, positive predictive values, and negative predictive values are shown in Table 3. All 57 KPC-possessing isolates showed increases of 5 mm or more in the zone diameters of the combined disks over those for cefotetan or cefepime alone (sensitivity, 100%). Boronic acid also enhanced remarkably (by  $\geq 7$  mm) the activities of all three carbapenems (imipenem, meropenem, and ertapenem) for all 57 KPC producers (sensitivity, 100%) irrespective of the carbapenem MICs, clearly

indicating the inhibitory activity of boronic acid against KPC enzymes. Figure 1a and b show the growth patterns of a representative KPC-possessing *K. pneumoniae* isolate without or with boronic acid and with meropenem, ertapenem, cefotetan, and cefepime as antibiotic substrates. This method showed lower sensitivity when cefoxitin or cefotaxime was used as a substrate (96.5% or 66.7%, respectively). The inhibitor affected the activity of ceftazidime against the 9 ESBL-negative isolates as well as the 2 SHV-11 producers but not against the remaining 46 SHV-12 producers (sensitivity, 19.3%), most likely due to the presence of the SHV-12 ESBL, which is not restrained by boronic acid.

None of the 106 isolates negative for KPC by PCR gave positive results in boronic acid tests using disks of cefepime,

TABLE 2. Results of the boronic acid disk tests for isolates with different  $\beta$ -lactamase contents

Characteristic of strain group (by PCR-confirmed $\beta$ -lactamase content)	No. (%) of isolates positive by the boronic acid test* with:							
	IPM	MER	EIP	FEF	CTT	FOX	CTX	CAZ
KPC positive ( $n = 9$ )	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)
KPC/ESBL positive ( $n = 48$ )	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	46 (95.8)	29 (60.4)	2 (4.2)
Total KPC-possessing isolates ( $n = 57$ )	57 (100)	57 (100)	57 (100)	57 (100)	57 (100)	55 (96.5)	38 (66.7)	11 (19.3)
VIM positive ( $n = 41$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (4.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
VIM/ESBL positive ( $n = 12$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AmpC positive ( $n = 9$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (100)	8 (88.9)	8 (88.9)	7 (77.8)
AmpC/ESBL positive ( $n = 31$ )	0 (0)	0 (0)	5 (16.1)	0 (0)	31 (100)	24 (77.4)	11 (35.5)	6 (19.4)
ESBL positive ( $n = 13$ )	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total non-KPC-possessing isolates ( $n = 106$ )	0 (0)	0 (0)	5 (4.7)	0 (0)	42 (39.6)	32 (30.2)	19 (17.9)	13 (12.3)

\* Abbreviations: IPM, imipenem; MER, meropenem; EIP, ertapenem; FEF, cefepime; CTT, cefotetan; FOX, cefoxitin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime.



TABLE 3. Summary of sensitivities, specificities, positive predictive values, and negative predictive values of the boronic acid tests using different antibiotic substrates in the phenotypic detection of KPC-producing isolates

Antibiotic used in boronic acid disk test	No. (%) of isolates confirmed by PCR as:		Test performance <sup>a</sup> (%)			
	Possessing KPC (n = 57)	Not possessing KPC (n = 106)	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Imipenem	57 (100)	0 (0)	100	100	100	100
Meropenem	57 (100)	0 (0)	100	100	100	100
Ertapenem	57 (100)	5 (4.7)	100	95.3	91.9	100
Cefepime	57 (100)	0 (0)	100	100	100	100
Cefotetan	57 (100)	42 (39.6)	100	60.4	57.6	100
Cefoxitin	55 (96.5)	32 (30.2)	96.5	69.8	63.2	97.4
Cefotaxime	38 (66.7)	19 (17.9)	66.7	82.1	66.7	82.1
Ceftazidime	11 (19.3)	13 (12.3)	19.3	87.7	45.8	66.9

<sup>a</sup> PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

imipenem, or meropenem (specificity, 100%) (Tables 2 and 3). When disks containing ertapenem were used, all isolates negative for KPC by PCR were correctly identified as KPC negative except for five AmpC producers that gave false-positive results (specificity, 95.3%) (Tables 2 and 3). Boronic acid tests using cefotetan, cefoxitin, cefotaxime, and ceftazidime as antibiotic substrates were positive for 42, 32, 19, and 13 isolates, respectively (specificities for KPC detection ranged from 60.4% to 87.7%) (Table 3). Figure 1c to h show the growth patterns of three representative non-KPC-producing *K. pneumoniae* isolates (harboring a VIM enzyme, plasmid-mediated AmpC, and ESBL, respectively) without or with boronic acid and with meropenem, ertapenem, cefotetan, and cefepime as antibiotic substrates. All these results were consistent for two different batches of Mueller-Hinton agar.

It is noteworthy that among the three antibiotic compounds (imipenem, meropenem, and cefepime) that correctly differentiated all 163 isolates in the study, meropenem demonstrated the largest differences in inhibition zone diameters between KPC producers and non-KPC producers (Fig. 2).

## DISCUSSION

KPC enzymes have become increasingly prevalent among *K. pneumoniae* isolates on the East Coast of the United States since the beginning of the last decade. They have also caused outbreaks in Israel and recently have become emerging public health concerns in several regions worldwide (3, 15, 18, 25). Given the limited therapeutic options available, the accurate detection of KPC-producing *K. pneumoniae* strains will be the crucial first step in controlling their spread and ensuring an optimal clinical outcome (3). Real-time PCR or multiplex PCR analyses may provide accurate results in the identification of KPC enzymes (11, 14). Molecular assays are increasingly utilized to detect antimicrobial resistance genes, but their accessibility is often limited to medical institutions, such as university hospitals. Thus, the current guidelines for phenotypic differentiation of KPC-producing organisms in U.S. hospitals are based on an indirect indicator, reduced susceptibility to ertapenem or meropenem (1, 4, 19), as well as performance of the modified Hodge test (1). However, nonsusceptibility to

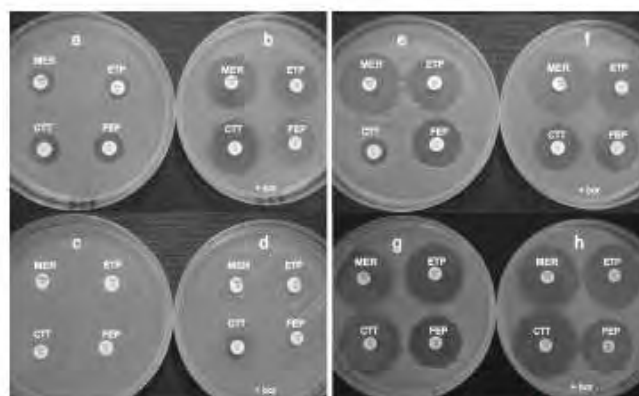


FIG. 1. Representative results using the boronic acid-based method without or with boronic acid (bor) for isolates possessing KPC/ESBL (a and b), VIM (c and d), AmpC/ESBL (e and f), or ESBL (g and h). MER, meropenem; ETP, ertapenem; CTT, cefotetan; FEP, cefepime.

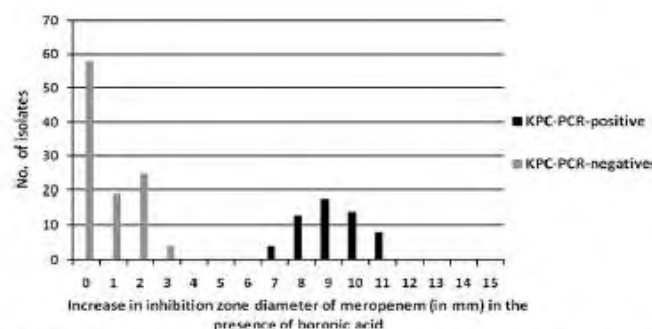


FIG. 2. Increases in the inhibition zone diameters of meropenem (in millimeters) in the presence of boronic acid for 57 isolates positive for KPC by PCR and 106 isolates negative for KPC by PCR.

ertapenem is not specific for carbapenemase production, especially when carbapenemase production is uncommon in a carbapenem-resistant bacterial environment, and obviously, a confirmation test is required. The modified Hodge test has been found to be an accurate assay for the phenotypic detection of KPC enzymes in hospitals where these enzymes predominate among non-carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* isolates (1). This technique is less costly but may give positive results when any enzyme with carbapenemase activity is present. Thus, practical, highly sensitive, and highly specific methods for the detection of KPC-possessing isolates are needed for regions where other carbapenem-resistant determinants are also prevalent.

Boronic acid compounds are known class C enzyme inhibitors, which are not based on a  $\beta$ -lactam structure (2). Disk tests based on their inhibitory activities were originally reported for the detection of plasmid-mediated AmpC enzymes among enterobacterial pathogens (7, 9). These tests were found to considerably increase the growth-inhibitory zones around disks of cefotetan, allowing the accurate differentiation of plasmid-mediated AmpC-producing isolates (7). Subsequently, boronic acid tests using disks of cefoxitin, cefotaxime, and ceftazidime were found to be successful at the detection of AmpC enzymes (27, 30).

It has been shown previously that boronic acid compounds also have inhibitory activity against other serine  $\beta$ -lactamases, such as the class A  $\beta$ -lactamase I from *Bacillus cereus* (13). However, no bacteriological data have been reported for any of these compounds. In the present study, we evaluate for the first time the use of boronic acid disk tests for the phenotypic detection of class A KPC-possessing *K. pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. The inhibitory activity of phenylboronic acid with several antibiotic substrates was tested against a large collection of clinical isolates, some positive and some negative for KPC by PCR. Our results are compatible with an enhanced affinity of the phenylboronic acid moiety with the active-site serine residue of class A KPC  $\beta$ -lactamase. Boronic acid tests using cefepime, imipenem, or meropenem as an antibiotic substrate demonstrated an excellent ability to differentiate KPC enzymes. The increase in the growth-inhibitory zone diameters was so great that it permitted easy recognition of KPC produc-

ers. Moreover, these tests allowed the accurate detection of KPC producers that exhibited low carbapenem MICs or were ESBL carriers. Boronic acid tests using disks of cefotetan or ertapenem were also highly sensitive in the detection of KPC producers. However, the cefotetan test, as expected, had low specificity for KPC detection, while the ertapenem test also gave false-positive results for a few AmpC-positive but KPC-negative isolates.

In our region, carbapenem resistance among *K. pneumoniae* clinical isolates is alarming and is attributed mostly to the production of VIM-type MBLs (12, 24). Also, plasmid-mediated AmpC-producing *K. pneumoniae* isolates are frequently detected and in several cases contribute to reduced susceptibility to carbapenems (unpublished data), which was observed among AmpC producers in the present study. In addition, carbapenem resistance due to a KPC-type carbapenemase was recently reported from a northern Greek hospital (28), and during the past year, KPC-possessing *K. pneumoniae* isolates have become established and have been increasingly detected in several tertiary-care Greek hospitals (unpublished data). Thus, in our region, where carbapenem resistance might also be caused by other resistance mechanisms, highly specific tests are needed to differentiate KPC producers. A recent study has shown that by use of benzo-thiophene-2-boronic acid as an inhibitor of AmpC enzymes, isolates with KPCs were wrongly inferred to have AmpC enzymes (17). Also, in two KPC-2-possessing clinical isolates from Argentina, synergism was detected between 3-aminophenylboronic acid disks and cefotaxime, ceftazidime, and carbapenem disks (20). It was assumed that the inhibitory activity of boronic acid was associated with the sole presence of the KPC enzyme, since no AmpC enzyme was detectable. In accordance with these observations, our study demonstrates that screening with boronic acid disks may accurately detect KPC producers among *K. pneumoniae* isolates that exhibit reduced susceptibility to either carbapenems, cefoxitin, or expanded-spectrum cephalosporins. According to the present results, boronic acid assays using cefepime or carbapenem disks are very simple, highly sensitive, and highly specific for the differentiation of KPC-possessing *K. pneumoniae* isolates and may be fully applicable for routine use in clinical microbiology laboratories. The tests



also seem to provide some useful information on the possible coproduction of an SHV-type ESBP, since the boronic acid test using ceftazidime was constantly negative for KPC producers that harbored SHV-12 ESBP. This test was positive for the two KPC producers that harbored SHV-11, most likely due to the weak activity of SHV-11 against expanded-spectrum cephalosporins.

Further studies will be needed to establish the reliability of boronic acid disk tests in detecting KPC enzymes among other pathogens, such as *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Proteus mirabilis*, as well as among pathogens possibly coproducing other broad-spectrum  $\beta$ -lactamases. It would also be of interest to test the specificity of boronic acid disk tests against *K. pneumoniae* isolates containing class D oxacillinases with considerable carbapenemase activity.

## REFERENCES

- Anderson, K. F., D. R. Lonsway, J. K. Rasheed, J. Biddle, B. Jensen, L. K. McDougal, R. B. Carey, A. Thompson, S. Stocker, B. Limbago, and J. B. Patel. 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 45:2723–2725.
- Beesley, T., N. Gascoyne, V. Knott-Hunziker, S. Petrusson, S. G. Waley, B. Jaurin, and T. Grundström. 1983. The inhibition of class C  $\beta$ -lactamases by boronic acids. *Biochem. J.* 209:229–233.
- Bratu, S., D. Landman, R. Haug, R. Recco, A. Eramo, M. Alam, and J. Quale. 2005. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch. Intern. Med.* 165:1430–1435.
- Bratu, S., M. Moaty, S. Nichani, D. Landman, C. Gullans, B. Pettinato, U. Karumudi, P. Tolane, and J. Quale. 2005. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3018–3020.
- Cao, V. T., G. Arlet, B. M. Ericsson, A. Tammelin, P. Courvalin, and T. Lambert. 2000. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:895–900.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th informational supplement. M100–S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Coudron, P. E. 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J. Clin. Microbiol.* 43:4163–4167.
- Crowley, B., V. J. Benedi, and A. Doménech-Sánchez. 2002. Expression of SHV-2  $\beta$ -lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3679–3682.
- Doi, Y., and D. L. Paterson. 2007. Detection of plasmid-mediated class C  $\beta$ -lactamases. *Int. J. Infect. Dis.* 11:191–197.
- Franklin, C., L. Liolios, and A. Y. Peleg. 2006. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 44:3139–3144.
- Hindiyeh, M., G. Smollen, Z. Grossman, D. Ram, Y. Davidson, F. Mileguir, M. Vax, D. Ben David, I. Tal, G. Rahav, A. Shamiss, E. Mendelson, and N. Keller. 2008. Rapid detection of *bla*<sub>KPC</sub> carbapenemase genes by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46:2879–2883.
- Ikonomidis, A., D. Tokatlidou, I. Kristo, D. Sofianou, A. Tsakris, P. Mantzani, S. Pournaras, and A. N. Maniatis. 2005. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*<sub>VIM-2</sub> metallo- $\beta$ -lactamase gene. *J. Clin. Microbiol.* 43:5344–5347.
- Kiener, P. A., and S. G. Waley. 1978. Reversible inhibitors of penicillinases. *Biochem. J.* 169:197–204.
- Kotlovsky, T., R. Shalginov, I. Austin, and H. Sprecher. 22 August 2008. Rapid detection of *bla*<sub>KPC</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* in a clinical setting. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* [Epub ahead of print.] doi:10.1007/s10096-008-0615-2.
- Leavitt, A., S. Navon-Venezia, I. Chmelinsky, M. J. Schwaber, and Y. Carmeli. 2007. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3026–3029.
- Lee, K., Y. Chong, H. B. Shin, Y. A. Kim, D. Yong, and J. H. Yum. 2001. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 7:88–91.
- Livermore, D. M., M. Warner, and S. Mushtaq. 2007. Evaluation of the chromogenic Cica- $\beta$ -Test for detecting extended-spectrum, AmpC and metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:1375–1379.
- Livermore, D. M., and N. Woodford. 2006. The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 14:413–420.
- Moland, E. S., N. D. Hanson, V. L. Herrera, J. A. Black, T. J. Lockhart, A. Hossain, J. A. Johnson, R. V. Goering, and K. S. Thomson. 2003. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:711–714.
- Pasteran, F. G., I. Otazgui, I. Guerriero, G. Radice, R. Maggiora, M. Rapoport, D. Faccone, A. Di Martino, and M. Galas. 2008. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1178–1180.
- Pérez-Pérez, F. J., and N. D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:2153–2162.
- Pournaras, S., M. Maniatis, N. Spanakis, A. Ikonomidis, P. T. Tassios, A. Tsakris, N. J. Legakis, and A. N. Maniatis. 2005. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- $\beta$ -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with *bla*<sub>VIM</sub> endemicity. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:761–764.
- Pournaras, S., A. Markogiannakis, A. Ikonomidis, I. Konydi, K. Bethinoti, A. N. Maniatis, N. J. Legakis, and A. Tsakris. 2006. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:557–561.
- Psichogiou, M., P. T. Tassios, A. Avlami, I. Stefanou, C. Kosmidis, E. Platouka, O. Paniara, A. Xanthaki, M. Tountouza, G. L. Daikos, and L. S. Tzouveleki. 2008. Ongoing epidemic of *bla*<sub>VIM-2</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:59–63.
- Queenan, A. M., and K. Bush. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:440–458.
- Song, W., I. K. Bae, Y. N. Lee, C. H. Lee, S. H. Lee, and S. H. Jeong. 2007. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by using boronic acid as an AmpC  $\beta$ -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 45:1180–1184.
- Tan, T. Y., S. Y. Ng, I. Teo, Y. Koh, and C. H. Teok. 2008. Detection of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *J. Clin. Pathol.* 61:642–644.
- Tsakris, A., I. Kristo, A. Poulou, F. Markou, A. Ikonomidis, and S. Pournaras. 2008. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:1257–1260.
- Tzelepi, E., C. Magana, E. Platouka, D. Sofianou, O. Paniara, N. J. Legakis, A. C. Viotopoulos, and L. S. Tzouveleki. 2003. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21:285–288.
- Yagi, T., J. Wachino, H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, and Y. Arakawa. 2005. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 43:2551–2558.



## Characteristics of Meropenem Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Clinical Isolates of *K. pneumoniae*<sup>▽</sup>

Spyros Pournaras,<sup>1\*</sup> Ioulia Kristo,<sup>1</sup> Georgia Vrioni,<sup>2</sup> Alexandros Ikonomidis,<sup>1</sup> Aggeliki Poulou,<sup>3</sup> Dimitra Petropoulou,<sup>4</sup> and Athanassios Tsakris<sup>2</sup>

Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa,<sup>1</sup> Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens,<sup>2</sup> Department of Microbiology, Serres General Hospital, Serres,<sup>3</sup> and Department of Microbiology, Saint Panteleimon General Hospital, Nicea,<sup>4</sup> Greece

Received 1 November 2009/Returned for modification 8 March 2010/Accepted 17 May 2010

Meropenem heteroresistance was investigated in six apparently meropenem-susceptible, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP) clinical isolates, compared with that in carbapenemase-negative, meropenem-susceptible controls. In population analyses, the KPC-KP isolates grew at meropenem concentrations of 64 to 256 µg/ml. Heteroresistant colonies had significantly elevated expression of the *bla*<sub>KPC</sub> gene compared with the native populations but did not retain heteroresistance when subcultured in drug-free media. Time-kill assays indicated that meropenem alone was not bactericidal against KPC-KP but efficiently killed the control strains.

Since the beginning of the last decade, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP) isolates have been increasingly detected in the United States and subsequently in several regions worldwide (3, 4, 13, 17, 21). KPC enzymes efficiently hydrolyze all β-lactam molecules (1, 22), conferring various levels of resistance to all β-lactam compounds, including carbapenems (13). However, KPC-producing *K. pneumoniae* may appear susceptible to carbapenems, mainly meropenem (2, 13), by reference CLSI agar dilution or broth microdilution methods as well as by automated systems (6, 15, 17). Characteristically, it has been reported that automated systems may identify as many as 87% of KPC-KP isolates to be susceptible to meropenem (13). The detection of the susceptibility level of KPC-KP isolates to carbapenems has been shown to be difficult due to the phenotypic heterogeneity that they commonly exhibit (3, 10, 13). For instance, in agar diffusion methods such as disk diffusion or Etest, the heterogeneous growth to carbapenems of KPC-KP results in the appearance of scattered colonies within the inhibition zones (9, 13).

These issues raise the need for cautious evaluation of susceptibility testing in KPC-KP isolates that are recovered in clinical laboratories. In our clinical laboratories, several KPC-KP isolates that appear susceptible by automated susceptibility assays or reference dilution assays contain heterogeneous subpopulations (D. Sofianou and K. Themeli-Digalaki, personal communications). It has been also shown that among Greek KPC-KP isolates, meropenem tends to exhibit lower MICs than imipenem or ertapenem (17, 20). In that respect, the aim of the present study was to characterize the heterogeneous mode of growth of apparently meropenem-susceptible KPC-KP clinical isolates by population analyses and bactericidal assays.

**Bacterial strains, susceptibility studies, and macrorestriction analysis.** Six KPC-2-producing *K. pneumoniae* clinical isolates from our laboratory collection were randomly selected for the study among those that were meropenem susceptible by agar dilution (MIC ≤ 4 µg/ml) (5) but exhibited scattered heterogeneous colonies around carbapenem discs. The isolates were recovered from separate patients hospitalized in four hospitals located in different Greek regions. *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and one meropenem-susceptible, non-carbapenemase-producing *K. pneumoniae* clinical isolate (KP 208) were used as controls. MICs of carbapenems, aminoglycosides, and other antimicrobials were determined by agar dilution and broth microdilution (5). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of SpeI-digested genomic DNA of the KPC-KP strains was performed with a CHEF-DRIII system (Bio-Rad, Hemel Hempstead, United Kingdom) (17).

**Population analysis and investigation of the stability of heteroresistance.** Population analyses utilizing meropenem were performed by spreading approximately 10<sup>8</sup> bacterial CFU on Mueller-Hinton agar plates with meropenem in serial dilutions for concentrations ranging from 0.25 to 256 µg/ml and incubating the plates for 48 h (16). The analysis was performed twice for all isolates, and the mean values of viable CFU were estimated and plotted on a semilogarithmic graph. The frequency of heteroresistant subpopulations at the highest drug concentration was calculated by dividing the number of colonies grown on antibiotic-containing plates by the colony counts from the same bacterial inoculum plated onto antibiotic-free plates. The stability of meropenem MICs for three distinct colonies grown at the highest drug concentration was determined by agar dilution after seven daily subcultures in antibiotic-free medium.

**Time-killing assays.** Killing curves utilizing meropenem, gentamicin, or meropenem plus gentamicin were performed as previously described (8). Briefly, tubes containing cation-supplemented Mueller-Hinton broth with antibiotics at concentrations equal to the MICs of the isolates were seeded with a

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Medical Microbiology, University Hospital of Larissa, 411 10 Larissa, Greece. Phone: 30 2413 502929. Fax: 30 2413 501570. E-mail: pournaras@med.uth.gr.

<sup>▽</sup> Published ahead of print on 26 May 2010.



TABLE 1. Characteristics of the study isolates<sup>a</sup>

Isolate	PFGE type	MEM MIC (μg/ml)	GEN MIC (μg/ml)	Highest MEM concn of growth in population analyses (μg/ml)	MEM MIC (μg/ml) of heterogeneous subpopulations
KP1	Ia	2	1	64	8
KP2	Ia	2	2	256	4
KP3	Ib	2	2	64	4
KP4	Ic	4	2	64	4
KP5	Ib	4	1	128	4
KP6	II	2	2	64	4
ATCC 13883	ND	0.06	0.5	0.25	NA
ATCC 27853	ND	0.25	2	0.5	NA
KP 208	III	0.12	0.5	0.5	NA

<sup>a</sup> MEM, meropenem; GEN, gentamicin; ND, not determined; NA, not applicable.

log-phase bacterial inoculum of  $5 \times 10^6$  CFU/ml (14) and incubated in a shaking water bath at 37°C. Samples (50 μl) of this broth culture were removed after 1, 3, 6, 9, 12, and 24 h for enumeration of viable bacteria by serial dilution and plating on antibiotic-free Mueller-Hinton agar plates. The analysis was performed three times for all isolates; the mean values of viable CFU were estimated and plotted on a semilogarithmic graph, and a 24-h time-kill curve was constructed for each isolate. Bactericidal activity (99.9% killing) was defined as a  $\geq 3$  log 10 CFU/ml reduction in viable cell counts with respect to the original inoculum (12, 14).

**Quantitative real-time PCR.** PCR detection and sequencing of *bla*<sub>KPC-2</sub> genes had been performed previously. Quantitative real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) for the expression of *bla*<sub>KPC-2</sub> was applied to the native populations and the colonies grown at the highest meropenem concentrations, collected directly for testing from the plates and also after 1-week subcultures in drug-free medium. The qRT-PCR was performed as described previously (11), using the 16S rRNA gene to standardize the expression level results (7). The measurements were done in triplicate using an MX3005P instrument (Stratagene, La Jolla, CA) with Brilliant SYBR green (Qiagen, Hilden, Germany). Gene expression in heteroresistant subpopulations was expressed as fold of increment relative to those of the respective native populations which were set as calibrators. Control reactions of untranscribed RNA were also included to check for contaminating DNA.

The meropenem Etest MICs of the KPC-KP isolates ranged from 1 to 4 μg/ml, but colonies grown within the zone of inhibition in Etest were observed at meropenem concentrations of 6 to 32 μg/ml. The KPC-KP isolates had imipenem, meropenem, and ertapenem agar dilution MICs of 4 to 16 μg/ml, 2 to 4 μg/ml, and 8 to  $>32$  μg/ml, respectively. They exhibited resistance to most antimicrobial classes and were susceptible only to colistin, tigecycline, and gentamicin. PFGE analysis showed two distinct genotypes; type I included five isolates with three subtypes, while type II had a single isolate (Table 1).

Population analysis assays for meropenem showed that  $2.3 \times 10^{-5}$  to  $1.5 \times 10^{-8}$  of the initial inoculum grew at concentrations ranging from 64 to 256 μg/ml for all six KPC-KP isolates (16 to 128 times their MICs), while the con-

trol isolates grew up to four times their initial meropenem MICs (Table 1). The dilution meropenem MICs of the heteroresistant colonies after 1-week subcultures in antibiotic-free medium ranged from 4 to 8 μg/ml, being similar to or slightly higher than those of the parental isolates (Table 1). qRT-PCR showed a statistically significant increase in the expression of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene between the native and the meropenem-heteroresistant subpopulations in all isolates (ranging from 0.475-fold to 1.07-fold,  $P < 0.01$ ), while the expression of *bla*<sub>KPC-2</sub> did not differ between native and heteroresistant colonies after seven subcultures in drug-free medium. It is therefore probable that the expression levels of *bla*<sub>KPC</sub> have contributed to the heteroresistant phenotype.

Time-killing studies utilizing the respective antimicrobials at  $1 \times$  MIC showed that meropenem when tested alone did not demonstrate bactericidal activity against the KPC-KP study isolates. Although a moderate reduction in viable cell counts was detected between 1 and 6 h of incubation, a substantial bacterial regrowth was detected in all KPC-KP isolates (Fig. 1B, panel I). Gentamicin was bactericidal against all KPC-KP isolates tested (Fig. 1B, panel II), while the combination of meropenem and gentamicin killed more rapidly all KPC-KP isolates (Fig. 1B, panel III). For gentamicin and meropenem with gentamicin, a bacterial regrowth was observed at 24 h in all KPC-KP isolates (Fig. 1B, panels II and III). The control strains were rapidly killed by all antibiotics, alone or in combination, and no bacterial regrowth was observed.

Carbapenem heteroresistance has been characterized previously in several Gram-negative rods, such as *Acinetobacter baumannii* and *P. aeruginosa* (8, 15). KPC-producing *Enterobacteriaceae* commonly exhibit a heterogeneous mode of growth to carbapenems, rendering difficult their detection and the estimation of their susceptibility levels (18). Population analyses in our collection of KPC-KP revealed that a proportion of the initial bacterial inocula consisted of heteroresistant subpopulations that grew at considerably higher meropenem concentrations. However, after subcultures in antibiotic-free medium, the colonies grown at the highest meropenem concentration exhibited MICs similar to those of the native isolates. The findings of the present study have shown that the growth of KPC-KP at high meropenem concentrations might be attributed to a temporary overexpression of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene, to the heavy bacterial inocula used in population analyses, or to other undefined mechanisms. Moreover, meropenem bactericidal assays revealed in all isolates a less pronounced killing that was followed by a substantial regrowth. This regrowth could be also due to a proportion of the meropenem-heteroresistant subpopulations that survived the meropenem exposure. The combination of meropenem and gentamicin at  $1 \times$  MIC resulted in an effective bacterial killing of the isolates and this could have significant implications for the treatment of infections caused by apparently meropenem-susceptible KPC-KP strains.

The detection of KPC-KP isolates poses a number of difficulties, since it cannot be based on reference dilution assays. It is shown that a low proportion of the initial bacterial inocula may grow at considerably higher meropenem concentrations. The CLSI agar dilution using  $10^4$  CFU/spot or the broth microdilution using  $5 \times 10^5$  CFU/ml may identify such strains as meropenem susceptible. In that respect, phenotypic assays eas-

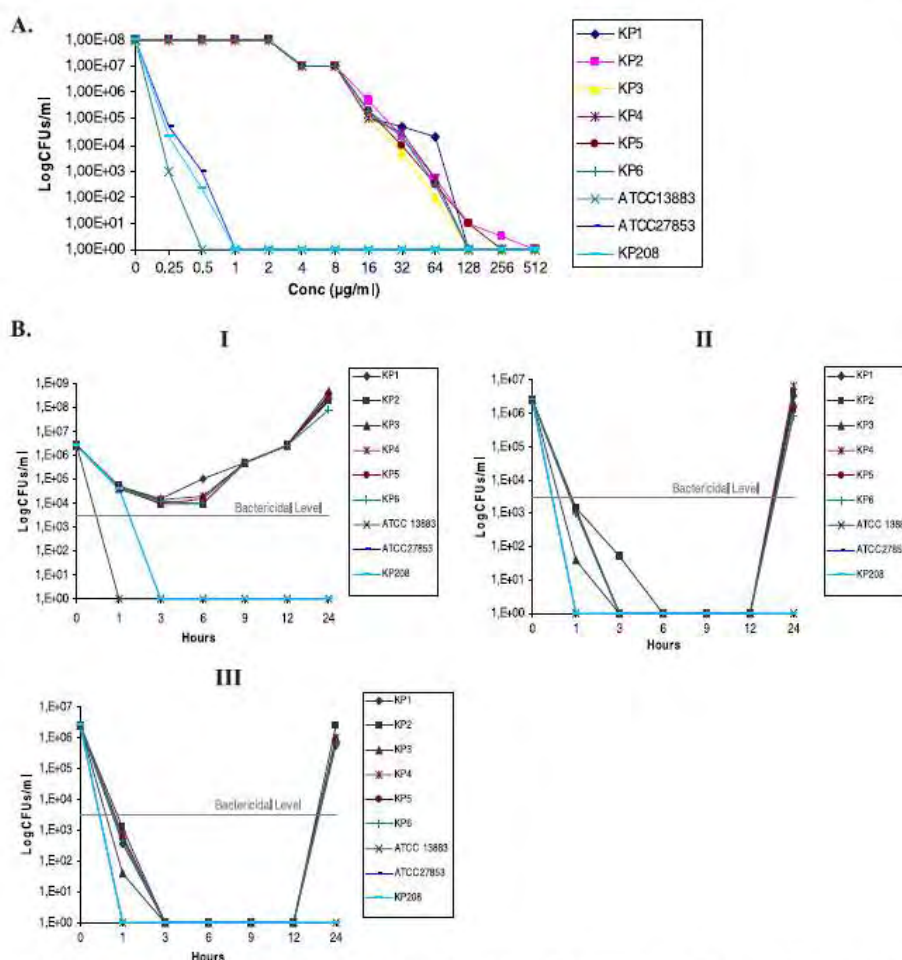


FIG. 1. (A) Meropenem population analysis profiles of the KPC-KP isolates and the control strains. (B) Bactericidal assays of the KPC-KP isolates and the control strains in Mueller-Hinton broth with 1x MIC of meropenem (panel I), gentamicin (panel II), and meropenem plus gentamicin (panel III). The dots correspond to mean values of three replicates for each isolate.

ily applicable in the clinical laboratory, such as the boronic acid disc assay (19) or, for larger laboratories, molecular methods, are needed for the effective identification of KPC-KP isolates.

Overall, the present study suggests that apparently meropenem-susceptible KPC-KP isolates may contain resistant subpopulations, which could survive under treatment with meropenem alone, possibly leading to treatment failures.

#### REFERENCES

- Alba, J., Y. Ishii, K. Thomson, E. S. Moland, and K. Yamaguchi. 2005. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4760–4762.
- Anderson, K. F., D. R. Lonsway, J. K. Rasheed, J. Biddle, B. Jensen, L. K. McDougal, R. B. Carey, A. Thompson, S. Stocker, B. Limbago, and J. B. Patel. 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 45:2723–2725.
- Bratu, S., D. Landman, R. Haag, R. Recco, A. Eramo, M. Alam, and J. Quale. 2005. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch. Intern. Med.* 165:1430–1435.
- Cai, J. C., H. W. Zhou, R. Zhang, and G. X. Chen. 2008. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2014–2018.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th informational supplement. M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Endimiani, A., A. M. Hujer, F. Perez, C. R. Bethel, K. M. Hujer, J. Kroeger, M. Oethinger, D. L. Paterson, M. D. Adams, M. R. Jacobs, D. J. Diekema, G. S. Hall, S. G. Jenkins, L. B. Rice, F. C. Tenover, and R. A. Bonomo. 2009. Characterization of *bla*<sub>KPC</sub>-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the eastern USA. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:427–437.
- Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann. 2009. CTX-M expression and selection of eropenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:832–834.
- Ikonomidis, A., E. Neou, V. Gogou, G. Vroni, A. Tsakris, and S. Pournaras.



2009. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 47:4055–4059.
9. Landman, D., S. Bratu, and J. Quale. 2009. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* 58:1303–1308.
10. Lomaestro, B. M., E. H. Tobin, W. Shang, R. Recco, A. Eramo, M. Alam, and J. Quale. 2005. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin. Infect. Dis.* 43:26–28.
11. Maniati, M., A. Ikonomidis, P. Mantzana, A. Daponte, A. N. Maniatis, and S. Pournaras. 2007. A highly carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel *bla*VIM-4/*bla*P1b integron over-expresses two efflux pumps and lacks OprD. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:132–135.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
13. Nordmann, P., G. Cuzon, and T. Naas. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 9:228–236.
14. Pankuch, G. A., G. Lin, H. Seifert, and P. C. Appelbaum. 2008. Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:333–336.
15. Pillai, D. R., R. Melano, P. Rawte, S. Lo, N. Tijet, M. Fuksa, N. Roda, D. J. Farrell, and S. Krajden. 2009. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 15:827–829.
16. Pournaras, S., A. Ikonomidis, A. Markogiannakis, N. Spanakis, A. N. Maniatis, and A. Tsakris. 2007. Characterisation of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *J. Med. Microbiol.* 56:66–70.
17. Pournaras, S., E. Protonotariou, E. Voulgari, I. Kristo, E. Dimitroulia, D. Vitti, M. Tsalidou, A. N. Maniatis, A. Tsakris, and D. Sofianou. 2009. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 64:348–352.
18. Samra, Z., O. Ofir, Y. Lishtzinsky, L. Madar-Shapiro, and J. Bishara. 2007. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30:525–529.
19. Tenover, F. C., R. K. Kalsi, P. P. Williams, R. B. Carey, S. Stocker, D. Lonsway, J. K. Rasheed, J. W. Biddle, J. E. McGowan, Jr., and B. Hanna. 2006. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1209–1213.
20. Tsakris, A., I. Kristo, A. Poulou, K. Themeli-Digalaki, A. Ikonomidis, D. Petropoulou, S. Pournaras, and D. Sofianou. 2009. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 47:362–367.
21. Woodford, N., J. Zhang, M. Warner, M. E. Kaufmann, J. Matos, A. Macdonald, D. Brudney, D. Sompolinsky, S. Navon-Venezia, and D. M. Livermore. 2008. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:1261–1264.
22. Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1151–1161.

## Detection of the new metallo-β-lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*

Spyros Pournaras<sup>1\*</sup>, Aggeliki Poulou<sup>2,3</sup>, Evangelia Voulgari<sup>3</sup>, Georgia Vroni<sup>3</sup>, Ioulia Kristo<sup>1</sup> and Athanassios Tsakris<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Serres General Hospital, Serres, Greece; <sup>3</sup>Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

\*Corresponding author. Tel: +30-2413-502929; Fax: +30-2413-501570; E-mail: pournaras@med.uth.gr

Received 24 April 2010; accepted 29 April 2010

**Objectives:** To report the identification of the metallo-β-lactamase (MBL) variant VIM-19 in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain co-producing KPC-2 carbapenemase, CMY-2 cephalosporinase and CTX-M-15 extended-spectrum β-lactamase.

**Methods:** MICs were determined by agar dilution. Phenotypic tests were performed to detect carbapenemase production. PCR and nucleotide sequencing were used for the identification of *bla* gene types and mapping of the integron carrying the MBL gene. The location of the MBL and KPC alleles was investigated by mating experiments, plasmid analysis and PCR assays.

**Results:** Imipenem, meropenem and ertapenem MICs for the study strain were 32, 16 and 64 mg/L, respectively. The strain carried *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> genes along with the gene *bla*<sub>VIM-19</sub>, which was located in a class 1 integron as the first gene cassette, followed by *aacA6*, *dfrA1* and *aadA1* cassettes. Mating experiments, plasmid analysis and PCR assays revealed that *bla*<sub>VIM-19</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> were carried on an ~150 kb self-transferable plasmid, while *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>TEM-1</sub> were on an ~70 kb self-transferable plasmid; *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was non-transferable.

**Conclusions:** The detection of the new MBL, VIM-19, which has enhanced carbapenemase activity, along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 is of concern. Further spread of the respective strains or plasmids may have serious consequences for antimicrobial chemotherapy.

**Keywords:** *bla*<sub>VIM-19</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, plasmids, transferable, conjugation, carbapenemases, MBLs

### Introduction

During the last few years, carbapenem resistance has been increasingly reported in *Klebsiella pneumoniae* and is largely attributed to the production of carbapenem-hydrolysing enzymes, such as metallo-β-lactamase (MBL) and *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) types.<sup>1,2</sup>

*K. pneumoniae* isolates producing KPC enzymes have become increasingly prevalent on the East Coast of the USA since 2001.<sup>2</sup> They have also caused outbreaks in Israel, and have recently become emerging public health concerns in several regions worldwide, such as China, Latin America and Greece.<sup>2</sup> The dissemination of KPC producers poses a significant threat for carbapenem activity, considering the increasing rates also of MBL-producing *K. pneumoniae*.

MBLs of the VIM group have been identified in different countries as a source of several nosocomial *K. pneumoniae*

outbreaks.<sup>1,2</sup> The VIM group currently includes 23 variants, clustered into three evolutionary lineages, represented by VIM-1, VIM-2 and VIM-7 (www.lahey.org/studies). In 2009, a new *bla*<sub>VIM</sub> gene variant, designated *bla*<sub>VIM-19</sub>, was detected in enterobacterial pathogens from Algiers and characterized by two research groups.<sup>3,4</sup> In both descriptions, the gene *bla*<sub>VIM-19</sub> was located as the first gene cassette in a class 1 integron with an unidentified 3' extremity.<sup>3,4</sup> In addition, Rodriguez-Martinez *et al.*<sup>4</sup> have shown that the amino acid substitutions by which VIM-19 differs from the closely resembled VIM-1 and VIM-4 enzymes confer increased carbapenem hydrolytic activity. During the same year, *K. pneumoniae* producing this potent VIM-19 carbapenemase, along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 enzymes, was identified in another Mediterranean region, Greece (GenBank accession number FJ 915116). The present report documents this worrisome evolution.

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

1604

Downloaded from <http://jac.oxfordjournals.org/> by Spyros Pournaras on July 20, 2010



## Materials and methods

### Bacterial isolates and phenotypic testing

*K. pneumoniae* strain KP1935 was recovered in May 2008 from a urinary tract infection of a 64-year-old female patient hospitalized at Serres General Hospital, Greece. MICs for the clinical and transconjugant strains of several  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, ciprofloxacin, trimethoprim, tetracycline, tigecycline and colistin were determined by agar dilution. The isolate was phenotypically screened for carbapenemase production by performing combined tests using four discs of meropenem, one without and the other three with EDTA, phenylboronic acid (PBA) or both EDTA and PBA.<sup>5</sup> *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and isolates from our laboratory collection that produce KPC, VIM and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) were used as controls in susceptibility assays.

### PCR assays and DNA sequencing

The detection of broad-spectrum  $\beta$ -lactamase genes (KPC, CMY and other plasmidic AmpC-like genes, OXA-48 carbapenemase, MBLs, and ESBLs of TEM, SHV and CTX-M types) was sought by PCR using consensus primers that were specific for each enzyme group.<sup>6</sup> Isolates from our collection that were previously characterized were used as controls in the PCR assays. For integron mapping, PCR assays combining primers specific for conserved 5'-CS and 3'-CS sequences with primers for *bla<sub>VIM</sub>*, *aacA*, *dfr*, *aadA*, *qacEΔ1* and *sul* genes were performed. PCR products of the genes tested and also of the *bla<sub>VIM</sub>*-carrying integron were sequenced on both strands. The *bla<sub>KPC</sub>*-flanking region PCR was mapped using a series of successive primers.<sup>7</sup>

### Conjugation assays and plasmid analysis

Filter mating experiments were performed using *Escherichia coli* 26R793 (*lac*<sup>+</sup>, *rif*<sup>r</sup>) as recipient. Selection of the transconjugants was made on MacConkey agar plates containing rifampicin (100 mg/L) and either

ampicillin (40 mg/L) or ertapenem (0.5–1 mg/L). Plasmid isolation was performed with the QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) and with a standard alkaline lysis protocol, using *E. coli* 39R861 as the standard plasmid control. The plasmid DNA bands of the transconjugants were extracted from the agarose gel, and used as templates in PCR for *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* genes.

## Results

The strain KP1935 was resistant or intermediate to all  $\beta$ -lactams, including carbapenems, with imipenem, meropenem and ertapenem MICs being 32, 16 and 64 mg/L, respectively. It also exhibited resistance to almost all alternative antimicrobials, including colistin (MIC 16 mg/L), and was susceptible to only tigecycline (MIC 2 mg/L) (Table 1). The simultaneous presence of both MBL and KPC carbapenemases was indicated by a positive combined-disc test using meropenem with both EDTA and PBA, while meropenem discs containing EDTA or PBA<sup>6</sup> were negative.

PCR for  $\beta$ -lactamase genes showed that KP1935 was positive for *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* and *bla<sub>KPC</sub>* genes, and negative for the remaining genes tested, including all *bla<sub>SHV</sub>* variants. Sequencing analysis identified *bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>VIM-19</sub>* and *bla<sub>KPC-2</sub>* alleles. PCR and sequencing using primers 5'-CS and 3'-CS in various combinations with primers for *bla<sub>VIM</sub>*, *aacA*, *aadA* and *dfrA1* genes revealed a new class 1 integron with a structure similar to that carrying the close variant gene *bla<sub>VIM-4</sub>* in an *Enterobacter cloacae* isolate from Greece.<sup>8</sup> The *bla<sub>VIM-19</sub>* gene cassette is located downstream of the *attI1* recombination site, followed by an *aacA6* cassette, a *dfrA1* cassette, an *aadA1* cassette and the 3'-CS, containing *qacEΔ1* and *sulI* (Figure 1). PCR mapping of the *bla<sub>KPC</sub>*-flanking region showed that this gene was located in a Tn4401 transposon similar to that found in *K. pneumoniae* isolates previously.<sup>7</sup>

**Table 1.** MICs of antibiotics for KP1935 and the respective transconjugants

Antibiotic	MICs (mg/L) of antibiotics for:			
	KP1935 (VIM-19+ KPC-2+ CTX-M-15)	Tcs <i>E. coli</i> 26R793 (pVIM-19+CMY)	Tcs <i>E. coli</i> 26R793 (pKPC-2)	<i>E. coli</i> 26R793
Imipenem	32	8	2	0.25
Meropenem	16	2	1	0.06
Ertapenem	64	8	2	0.06
Ampicillin	>32	>256	>256	4
Amoxicillin+CLA	>256	256	64	4
Piperacillin+TZB	>256	>256	256	1
Aztreonam	>256	4	32	0.12
Ceftazidime	>256	>256	16	1
Cefotaxime	>32	>32	16	0.12
Cefepime	128	64	8	0.06
Cefoxitin	>256	>256	16	4
Ciprofloxacin	>32	0.03	0.03	0.03
Gentamicin	64	1	1	1
Amikacin	16	16	2	2
Trimethoprim	>256	>256	0.25	0.25
Tetracycline	>256	128	1	1
Tigecycline	2	0.25	0.12	0.12
Colistin	16	0.06	0.06	0.06

CLA, clavulanic acid (2 mg/L); TZB, tazobactam (4 mg/L); Tcs, transconjugant strain.



- 2 Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; **9**: 228–36.
- 3 Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J et al. Novel VIM metallo-β-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 466–70.
- 4 Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P, Fortineau N et al. VIM-19, a metallo-β-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 471–6.
- 5 Pourmaras S, Paulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1319–1321.
- 6 Pourmaras S, Protonotariou E, Voulgari E et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 348–52.
- 7 Naas T, Cuzon G, Villegas MV et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β-lactamase *bla<sub>KPC</sub>* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1257–63.
- 8 Ikonomidis A, Spanakis N, Paulou A et al. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo-β-lactamase and SHV-2a extended-spectrum β-lactamase in a conjugative plasmid. *Microb Drug Resist* 2007; **13**: 221–6.
- 9 Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I et al. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla<sub>VIM-1</sub>* metallo-β-lactamase gene. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5344–7.
- 10 Peleg AY, Bell JM, Hofmeyr A et al. Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 794–5.
- 11 Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M et al. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4048–50.



## Molecular Cloning and Biochemical Characterization of VIM-12, a Novel Hybrid VIM-1/VIM-2 Metallo- $\beta$ -lactamase from a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate, Reveal Atypical Substrate Specificity<sup>†</sup>

Maria Kontou,<sup>‡</sup> Spyros Pournaras,<sup>§</sup> Ioulia Kristo,<sup>‡,§</sup> Alexandros Ikonomidis,<sup>§</sup> Antonios N. Maniatis,<sup>§</sup> and Constantinos Stathopoulos<sup>\*,‡,||</sup>

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos st., 41221 Larissa, Greece, Department of Microbiology, School of Medicine, University of Thessaly, 41222 Larissa, Greece, and Institute of Biomedical Research and Technology (BIOMED), 51 Papanastasiou st, 41222 Larissa, Greece

Received June 27, 2007; Revised Manuscript Received August 2, 2007

**ABSTRACT:** Metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) are considered an emerging family of Zn<sup>2+</sup>-dependent enzymes that significantly contribute to the resistance of many nosocomial pathogens against  $\beta$ -lactam antimicrobials. Since these plasmid-encoded enzymes constitute specific molecular targets for  $\beta$ -lactams, their exact mode of action is greatly important in deploying efficient anti-infective treatments and for the control of severe multi-resistant nosocomial infections, which becomes a global problem. A novel hybrid VIM-1/VIM-2-type  $\beta$ -lactamase (named VIM-12) has recently been identified in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* in Greece. The sequence of this enzyme is highly similar with that of VIM-1 at its N-terminal region and with that of VIM-2 at its C-terminal region, raising the question of whether this sequence similarity reflects also a similar functional role. Moreover, the possible contribution of this novel  $\beta$ -lactamase to the overall antibiotic resistance of this specific clinical isolate was investigated. The gene encoding VIM-12 was cloned and expressed, and the recombinant enzyme was used for detailed kinetic analysis, using a variety of  $\beta$ -lactam antibiotics. VIM-12 was found to exhibit narrow substrate specificity, compared to other known  $\beta$ -lactamases, limited mainly to penicillin and to a much lesser extent to imipenem. Interestingly, meropenem was found to act as a noncompetitive inhibitor of the enzyme, although the active site of VIM-12 exhibited complete conservation of residues among VIM enzymes. We conclude that VIM-12 represents a novel and unique member of the family of known metallo- $\beta$ -lactamases, exhibiting atypical substrate specificity.

The production of  $\beta$ -lactamases is a predominant mechanism of bacterial resistance, and more than 470  $\beta$ -lactamases, either chromosomally or plasmid-mediated, have been described to date (1). They are clustered into four classes: three serine-dependent [serine- $\beta$ -lactamases (SBLs)] enzyme classes (A, C, and D) and one metal-dependent [metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs)] class (B) (2). The MBLs are zinc-dependent hydrolases and are completely distinct from their serine counterparts in terms of sequence, fold, and mechanism (3, 4). They are small enzymes sharing a common four-layer  $\alpha\beta/\beta\alpha$  fold, with a central  $\beta$ -sandwich and two  $\alpha$ -helices on either side (5, 6). This motif, arising possibly by a gene duplication event (7), is also found in other proteins (glyoxalases and certain flavoenzymes) (8, 9) and exhibits an intrinsic metal-binding site, located at the edge of the

$\beta$ -sandwich (10, 11). For the metallo- $\beta$ -lactamases, this site is occupied by a divalent zinc ion having a tetrahedral array of three histidines and water. The role of zinc in the hydrolytic mechanism, beyond that of Lewis acid catalysis, is not certain. Nonetheless, there is a consensus that the water ligand of the zinc ion is the  $\beta$ -lactam ring opening nucleophile, via a mechanism parallel to that of the zinc metallo-proteases (12–15).

Three MBL subclasses (B1–B3) exist (16). Despite a very low degree of sequence similarity among the three subclasses, the general structures and the relative positions of the secondary structure elements are similar, in particular among enzymes of subclasses B1 and B2 (17, 18). Gram-negative microorganisms producing acquired MBLs are increasingly implicated in nosocomial infections. Two distinct MBL types, IMP (19) and VIM<sup>1</sup> (20), are more commonly detected worldwide, while two additional types, GIM (21) and SPM (22), have been sporadically detected. The sequences of the former MBL types, though, are less than 40% identical, and they exhibit similar kinetic properties, efficiently hydrolyzing most  $\beta$ -lactam compounds, including carbapenems (23). Additionally, both *bla*<sub>IMP</sub>- and *bla*<sub>VIM</sub>-type genes are carried as gene cassettes by class 1 integrons.

<sup>†</sup> This work was supported in part by a Research Grant from the University of Thessaly Research Committee (to C.S.).

\* To whom correspondence should be addressed: Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos st., 41221 Larissa, Greece. Telephone: +30-2410-565278. Fax: +30-2410-565290. E-mail: cstath@bio.uth.gr.

<sup>‡</sup> Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly.

<sup>§</sup> Department of Microbiology, School of Medicine, University of Thessaly.

<sup>||</sup> Institute of Biomedical Research & Technology (BIOMED).

<sup>1</sup> Abbreviation: VIM, Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase.



The VIM-type MBLs belong to subclass B1 of molecular class B. So far, 13 published VIM variants have been described that can be clustered into three groups on the basis of sequence similarity (24), represented by VIM-1 (25), VIM-2 (26), and VIM-7 (27). The VIM-1 group also comprises VIM-4, VIM-5, and VIM-11A (28–30). Six VIM variants (VIM-3, -6, -8, -9, -10, and -11B) are considered derivatives of VIM-2 (31–33). The amino acid sequence of VIM-2 is 90% identical with that of VIM-1 (26), and apparently, VIM-2 is the most widespread VIM-type MBL (34). VIM-type MBLs were first described in *Pseudomonas aeruginosa* (25) and thereafter in other Gram-negative non-fermenters and enterobacterial species such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* (32, 35–38). Recent studies indicate that VIM-producing microorganisms are endemic in various Mediterranean countries, including Greece, as well as in the Far East (38–41).

Despite the fact that the amino acid sequences of VIM-1 and VIM-2 diverge by only 7%, notable differences have been reported for their kinetic parameters using several  $\beta$ -lactam substrates, suggesting that the few structural differences between these two natural variants have functional significance (42). The detailed characterization and the elucidation of the catalytic mechanisms employed by MBLs are prerequisites for rational inhibitor design. In the challenging quest for new specific inhibitors, a detailed understanding of their biochemical properties and structure is desirable.

In this study, we focused on the biochemical characterization and kinetic analysis of a novel plasmid-encoded MBL (named VIM-12) from a *K. pneumoniae* clinical isolate, which is anchored by a gene cassette inserted into a class 1 integron (43). The clinical isolate was recovered in Thessaloniki, Greece, from blood cultures of a 67-year-old surgical patient. The same VIM-12 enzyme was recently identified from our group also in an *E. coli* clinical isolate (44). The sequence of the 266-amino acid VIM-12 polypeptide is 97.0 and 93.6% identical with those of VIM-1 and VIM-2, respectively (Figure 1a). Preliminary kinetic experiments assessing the enzyme's activity in the presence of various antibiotics showed interestingly that VIM-12 was hydrolyzing efficiently only penicillin and not other antibiotics. In an attempt to further characterize this unusual enzymatic behavior, we cloned the corresponding gene, purified the recombinant enzyme, and performed detailed kinetic analysis and competition experiments in the presence of various antibiotics (Figure 2). Our aim was to extract information about the mechanism of antibiotic resistance, which would be of great clinical importance.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial Strains and Plasmids and MIC Determinations.** *K. pneumoniae* 2873 was the clinical isolate which harbored the *bla*<sub>VIM-12</sub> gene. *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) was used as the host strain for recombinant plasmid pGEM-Teasy Vector (Promega), and *E. coli* BL21 (Novagen) was used for the overexpression of the VIM-12 enzyme. Plasmid pGEM-Teasy Vector was used for the cloning and sequencing of the PCR-amplified fragment of the *bla*<sub>VIM-12</sub> gene. Plasmid pET15b (Novagen) was used as a T7-based expression vector for the overexpression of the *bla*<sub>VIM-12</sub> gene. MICs for

penicillin G, imipenem, meropenem, ceftazidime, aztreonam, cefotaxime, and cefoxitin were determined by Etest and Etest MBL (AB Biodisk, Solna, Sweden) in *E. coli* strain BL21 with and without the insertion of the *bla*<sub>VIM-12</sub>-carrying plasmid pET15b, an *E. coli* transconjugant carrying *bla*<sub>VIM-12</sub> in the originally described p2873 plasmid and clinical *E. coli* strain 28 from our collection carrying *bla*<sub>VIM-12</sub>.

**Cloning and Expression of the *bla*<sub>VIM-12</sub> Gene.** The *bla*<sub>VIM-12</sub> gene was amplified by PCR using the following set of primers: VIM-12 F (5'-GCATATGTTAAAGT-TATTAGTAGTTTATTGG-3') and VIM-12 R (5'-GGATC-CCTACTCAACGACTGAG-3') (the underline indicates the *Nde*I and *Bam*HI restriction sites, respectively). Plasmid DNA extracted from *K. pneumoniae* 2873 (Qiagen DNA Miniprep Kit) was used as the template in the PCR which was performed under the following conditions: 2 min at 95 °C, 30 cycles of denaturation for 45 s at 95 °C, annealing for 1 min at 52 °C, extension for 1 min at 72 °C, and a final extension for 10 min at 72 °C. The PCR product was cloned via TA cloning into plasmid pGEM-Teasy Vector (Promega) and was sequenced to ensure that no mutations were incorporated. The recombinant plasmid was transformed into DH5 $\alpha$  cells, and plasmid extract from the transformed cells was digested with *Nde*I and *Bam*HI enzymes. The restriction fragment was subcloned into the pET15b vector (Novagen) which was transformed into *E. coli* BL21 for overexpression. The strain was grown aerobically in 2 L of buffered Luria-Bertani medium containing chloramphenicol (100  $\mu$ g/mL), at 37 °C. Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma Chemical Co.) was added to a final concentration of 0.5 mM when the culture reached an *A*<sub>600</sub> of 0.6, and the incubation was continued for an additional 5 h at 20 °C.

**Purification of the VIM-12 Metallo- $\beta$ -lactamase.** The VIM-12 enzyme was purified from *E. coli* BL21 carrying recombinant plasmid pET15b-*bla*<sub>VIM-12</sub> as follows. Cells from a 1 L culture were harvested by centrifugation (4000g for 20 min), resuspended in 10 mL of 50 mM Hepes-KOH (pH 8.0) containing 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 0.1% Triton, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10  $\mu$ g/mL lysozyme, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), and 5% glycerol, and disrupted by sonication. The lysate was clarified by centrifugation at 100000g for 1 h, and the supernatant was used for purification of the enzyme using an agarose Ni-NTA column (Qiagen) equilibrated in 50 mM Hepes-KOH buffer (pH 8.0) containing 100  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM PMSF, and 5% glycerol. The column was washed with the same buffer supplemented with 20 mM imidazole, and the enzyme was eluted with the same buffer including 500 mM imidazole. The fractions containing  $\beta$ -lactamase were detected after SDS-PAGE analysis and subsequent Coomassie Brilliant Blue or silver staining (>95% pure), followed by immunoblotting using an anti-His antibody which confirmed the presence of the recombinant protein in the elution fractions. To ensure that no contaminant proteins of the same molecular mass with VIM-12 were comigrating in the SDS-PAGE analysis, *E. coli* lysates from cultures without induction were used to perform the same affinity purification scheme. The active fractions containing recombinant VIM-12 were supplemented with 20% glycerol and were immediately stored at -20 °C to avoid any loss of enzymatic activity.



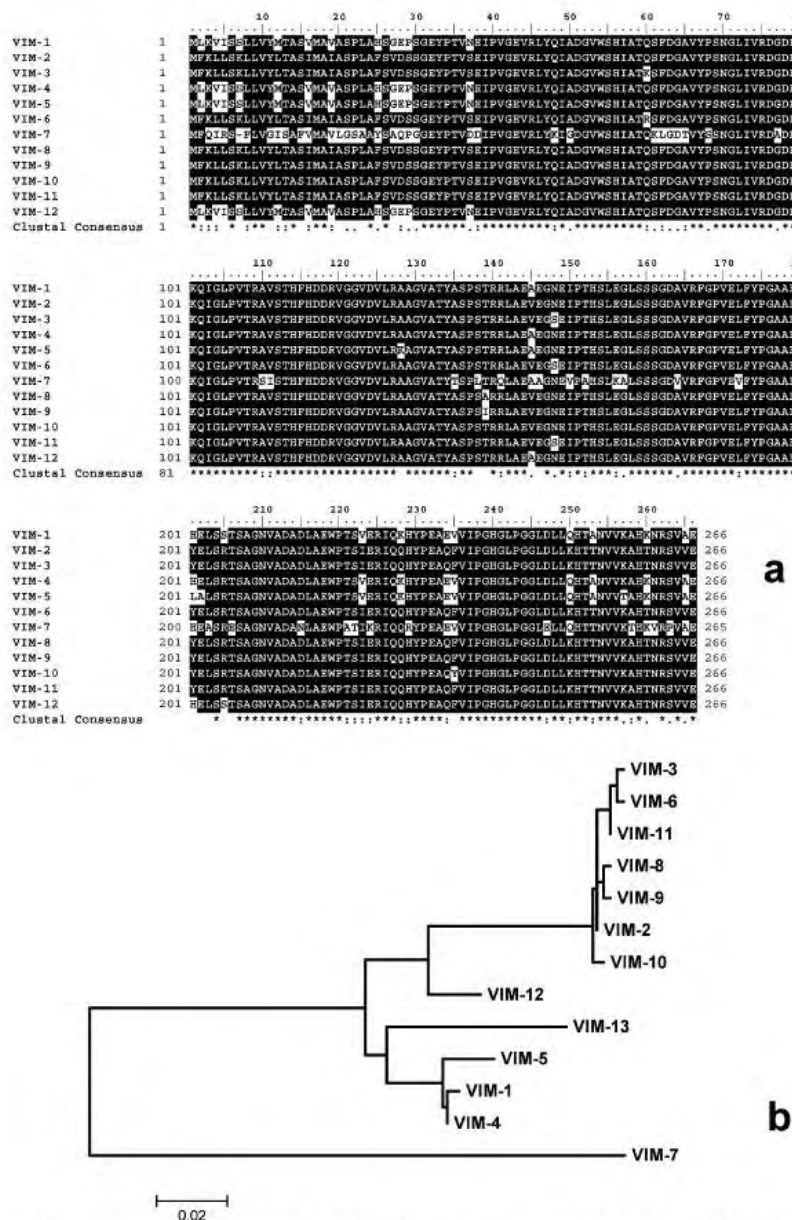


FIGURE 1: (a) Clustal-W protein sequence alignment of all published VIM-type MBLs generated by using the PAM350 matrix. (b) Neighbor-joining dendrogram showing the relatedness of VIM-12 and other acquired VIM-type MBLs. Calculation of the tree was based on panel a.

**VIM-12 Activity Assay and Determination of Kinetic Parameters.** In general, substrate hydrolysis by VIM-12 (1–5  $\mu$ M) was monitored by following the absorbance variation at 40  $^{\circ}$ C, in 50 mM Hepes-KOH (pH 6.8) supplemented with 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> and 10 mM KCl in a 1 mL final volume of reaction mixture, using a lambda 2 spectrophotometer (Perkin-Elmer, Rahway, NJ) equipped with thermostatically controlled cells. The progress of the hydrolysis of antibiotics

was monitored in 30 s intervals following the initial velocity of the reaction and stopped when it reached a plateau. The wavelengths used were 235 nm for penicillin G (10–500  $\mu$ M), 299 nm for imipenem (10–500  $\mu$ M) and meropenem (10–500  $\mu$ M), 292 nm for aztreonam (50–500  $\mu$ M), 237 nm for ceftazidime (10–200  $\mu$ M), 257 nm for cefotaxime (50–100  $\mu$ M), and 295 nm for cefoxitin (500  $\mu$ M). For the determination of optimal assay conditions, we tested the



## Characterization of VIM-12 Substrate Specificity

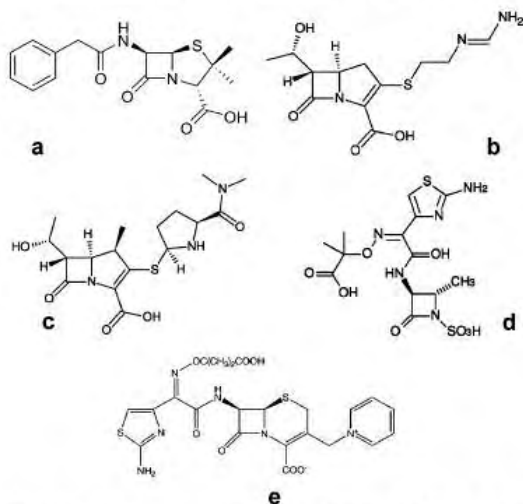


FIGURE 2: Chemical structures of all antibiotics used in this study as substrates of VIM-12: (a) penicillin G, (b) imipenem, (c) meropenem, (d) aztreonam, and (e) ceftazidime.

activity of VIM-12 at different pH values (range of 6.0–8.5), different temperatures (range of 25–50 °C),  $Zn^{2+}$  concentrations (0–500  $\mu M$ ), and KCl concentrations (0–100 mM). Since  $Zn^{2+}$  ions are important for optimal enzyme activity, we tried to replace them with either  $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$  metal ions (50–100  $\mu M$ ) to identify any effects on the enzyme's activity.

The steady-state kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were determined (under standard assay conditions) by analyzing  $\beta$ -lactam hydrolysis under initial rate conditions using the Lineweaver–Burk linearization of the Michaelis–Menten equation, with the statistic package GraFit (45). The  $k_{cat}$  values were calculated by dividing the  $V_{max}$  values by the concentration of the recombinant enzyme. Competition experiments were performed to study the interaction of imipenem (50–300  $\mu M$ ), meropenem (1–20  $\mu M$ ), ceftazidime (50–300  $\mu M$ ), and aztreonam (50–300  $\mu M$ ) with the enzyme, using penicillin G (50–300  $\mu M$ ) as the reporter substrate. The susceptibility to inhibition was determined with and without preincubation of the enzyme with various concentrations of each antibiotic for 10 min at 40 °C, before measuring the residual  $\beta$ -lactamase activity.

## RESULTS

**Purification of Recombinant VIM-12.** In this study, a novel plasmid-encoded VIM-type metallo- $\beta$ -lactamase from a clinical isolate of *K. pneumoniae* is described. The electrophoresis of the PCR product revealed a DNA band with an expected size of 801 bp. Sequencing of the PCR product verified the expected size and the fact that no mutations were incorporated. Subsequent cloning of the gene into the pET15b expression vector resulted in N-terminal His<sub>6</sub>-tagged VIM-12 that was purified in one step on a Ni-NTA affinity chromatography column. VIM-12 was judged to be >95% pure by SDS–PAGE analysis followed by either Coomassie Brilliant Blue or silver staining. The same purification protocol was used for *E. coli* cell lysates that were not

Biochemistry, Vol. 46, No. 45, 2007 13173

subjected to IPTG induction. There were no detectable contaminant protein bands migrating at the same molecular mass as recombinant VIM-12. Therefore, we concluded that the recombinant VIM-12 isolated from the elution fractions could be subsequently used for further biochemical analysis. In addition, an anti-His antibody was used to detect the presence of VIM-12 and to further ensure that the purification was not masked by contaminant proteins. VIM-12 was migrating with an apparent molecular mass of 28 kDa which was consistent with the predicted molecular mass of the protein (Figure 3). The sequence of VIM-12 polypeptide (266 amino acids, molecular weight of 28 120) was 97.0 and 93.6% identical with those of VIM-1 and VIM-2, respectively (Figure 1a). VIM-12 differs from VIM-1 by eight amino acid residues at positions 246, 251, 257, 258, 284, 287, 294, and 299 (standard class B metallo- $\beta$ -lactamase numbering scheme) (46). All these residues are located at the protein surface and are distant from the active site. A dendrogram based on CLUSTAL W (47) multiple alignment of the VIM lactamases showed that VIM-12 was clustered between the VIM-1 and VIM-2 groups (Figure 1b).

**Biochemical Characterization of VIM-12 Metallo- $\beta$ -lactamase.** On the basis of the high degree of sequence similarity between VIM-12 and VIM-1 and VIM-2 (Figure 1a), we expected that the substrate specificity of this hybrid metallo- $\beta$ -lactamase would not be significantly different from that of VIM-1 or VIM-2, a hypothesis that was subsequently tested. The optimal conditions of the VIM-12 lactamase activity were determined by performing  $\beta$ -lactam antibiotic hydrolysis assays, in 50 mM Hepes–KOH buffer, at different pH values, different temperatures, different metal ion concentrations ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , and  $Mn^{2+}$ ), and different KCl concentrations, using as a substrate penicillin G. The hydrolytic activity of VIM-12 was optimal at pH 6.7 and 40 °C (see the Supporting Information). Addition of zinc ions to a final concentration of 50 or 100  $\mu M$  did not affect the hydrolytic activity of the enzyme, while concentrations higher than 100  $\mu M$  had a considerable negative effect. Concentrations of KCl higher than 20 mM weakened slightly the hydrolytic ability of VIM-12. The substitution of zinc ions with magnesium and manganese ions did not support the activity of the enzyme.

**Determination of Kinetic Parameters of VIM-12.** The kinetic parameters of the purified VIM-12 were determined in the presence of several  $\beta$ -lactam substrates (Figure 2). Surprisingly, the biochemical assays revealed that VIM-12 exhibited a narrow substrate profile, as only penicillin G was efficiently hydrolyzed (Figure 4a). VIM-12 also exhibited a moderate rate of hydrolysis of imipenem (Figure 4b), with a relative  $k_{cat}/K_m$  value of 0.0003  $\mu M^{-1} s^{-1}$ . Also, hydrolysis of meropenem, ceftazidime, cefoxitin, and cefotaxime was not observed, in contrast to other VIM-type lactamases (Figure 4b). Moreover, we did not observe hydrolysis with the monobactam aztreonam. The following kinetic parameters were determined:  $V_{max} = 616.07 \pm 21.37 \mu M/min$  and  $K_m = 280.11 \pm 28.04 \mu M$  for penicillin G (Figure 5a), and  $V_{max} = 0.507 \pm 0.030 \mu M/min$  and  $K_m = 93.62 \pm 11.1 \mu M$  for imipenem (Figure 5b). Although VIM-12 hydrolyzes imipenem very slowly, this specific antibiotic represents a true substrate for VIM-12 and in the subsequent experimentation was manipulated as such. The  $k_{cat}$  values were calculated by dividing the respective  $V_{max}$  value by the concentration of

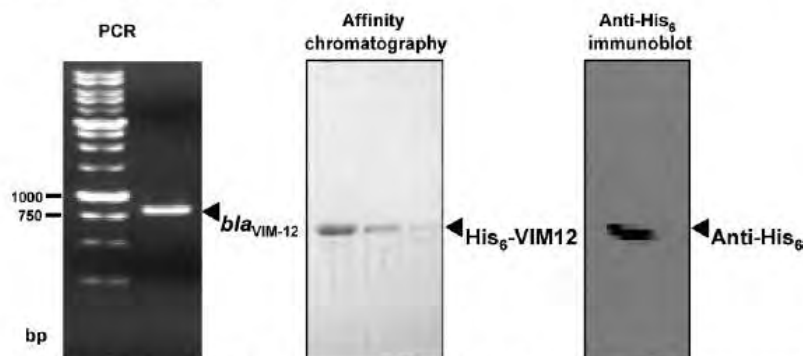


FIGURE 3: PCR amplification of  $bla_{VIM-12}$  (left), purification on a Ni-NTA affinity chromatography column (center), and immunoblot analysis of a representative fraction containing purified  $His_6$ -VIM-12 (right).

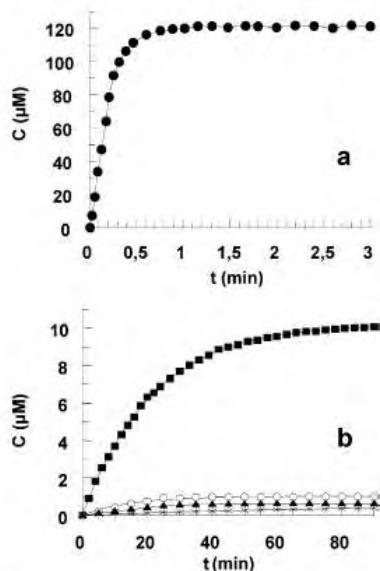


FIGURE 4: Representative hydrolysis curves of various  $\beta$ -lactam compounds in the presence of recombinant VIM-12: (a) penicillin G (●) and (b) imipenem (■), meropenem (○), aztreonam (×) and ceftazidime (▲). All reactions were carried out as described in Materials and Methods.

the recombinant VIM-12. This calculation was based on the assumption that all the enzyme molecules were active. In addition, we did not observe any decrease in the enzymatic activity during the experimental procedure.

To study the mode of interaction of VIM-12 with the antibiotics that were not hydrolyzed, competition experiments were conducted using penicillin G as the reporter substrate. These inhibition studies would reveal whether the  $\beta$ -lactamase was able to bind these antibiotics via its active site. The initial velocity in the presence or absence of inhibitors was determined from the initial slopes of time plots. Data obtained from these assays were used to create the corresponding Lineweaver–Burk diagrams and to calculate the inhibition constants for each antibiotic. Figure 6a shows double-reciprocal plots with increasing concentrations of meropenem. The slope of the line was replotted against the

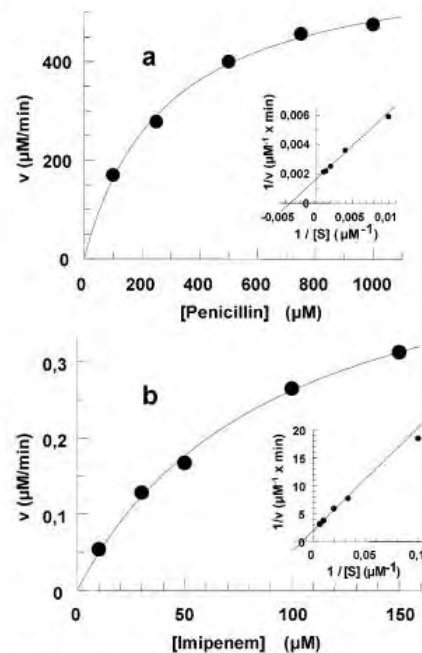


FIGURE 5: Penicillin and imipenem hydrolysis by recombinant VIM-12. (a) Michaelis–Menten plot of penicillin hydrolysis. The inset is a double-reciprocal plot ( $1/v$  vs  $1/[penicillin]$ ). (b) Michaelis–Menten plot of imipenem hydrolysis. The inset is a double-reciprocal plot ( $1/v$  vs  $1/[imipenem]$ ).

concentrations of meropenem, and the results are shown in the top panel. The linearity of this plot is indicative of simple noncompetitive inhibition and led to the determination of a  $K_i$  value of 4.2  $\mu$ M. Further evidence for simple noncompetitive kinetics for meropenem comes from the Dixon plot (Figure 7a). The same detailed kinetic analysis was performed for imipenem, ceftazidime, and aztreonam. In contrast with meropenem, imipenem exhibits simple competitive inhibition (Figure 6b). The slope of the line was replotted against the concentrations of imipenem, and the results are shown in the top panel. The linearity of this plot is indicative of simple competitive inhibition with a calculated  $K_i$  value of 80.6  $\mu$ M. The Dixon plot (Figure 7b)



## Characterization of VIM-12 Substrate Specificity

Biochemistry, Vol. 46, No. 45, 2007 13175

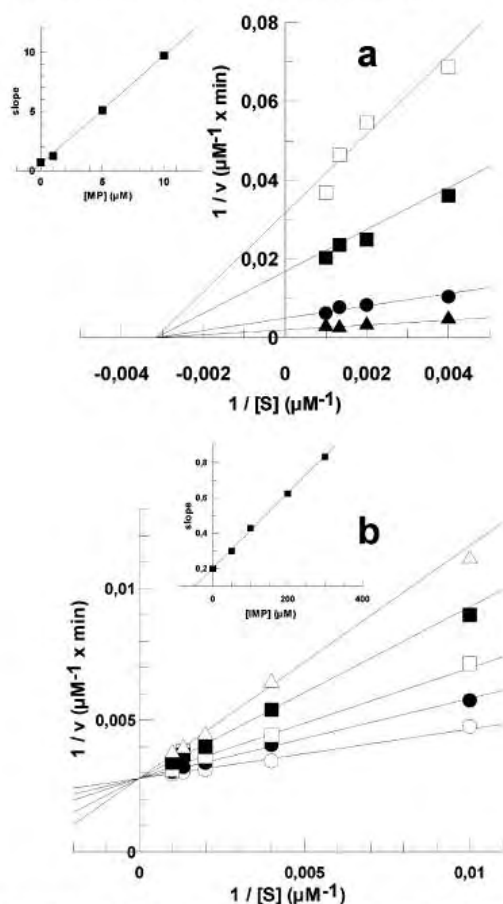


FIGURE 6: (a) Double-reciprocal plot ( $1/v$  vs  $1/[\text{penicillin}]$ ) for the hydrolysis of penicillin by VIM-12 in the presence of meropenem. The reaction was carried out at each one of the indicated concentrations in the presence or absence of inhibitor (meropenem). All reactions were carried out at  $40^\circ\text{C}$  as described in Materials and Methods: without meropenem (▲) or with 1 (●), 5 (■), or 10  $\mu\text{M}$  meropenem (□). The inset is a replot of the slopes of the double-reciprocal lines vs meropenem (MP) concentration. (b) Double-reciprocal plot ( $1/v$  vs  $1/[\text{penicillin}]$ ) for the hydrolysis of penicillin by VIM-12 in the presence of imipenem. The reaction was carried out at each one of the indicated concentrations in the presence or absence of inhibitor (imipenem). All reactions were carried out at  $40^\circ\text{C}$  in 1 mL of 50 mM HEPES buffer (pH 6.8) without imipenem (○) or with 50 (●), 100 (□), 200 (■), or 300  $\mu\text{M}$  imipenem (Δ). The inset is a replot of the slopes of the double-reciprocal lines vs imipenem concentration.

confirmed this mode of inhibition. Ceftazidime acts as a very weak simple noncompetitive inhibitor, while aztreonam exhibited no inhibitory effect whatsoever. The inhibition constants determined for each antibiotic in this study were compared with previously reported values and are summarized in Table 1. The results that we obtained with and without preincubation of the enzyme with each antibiotic were identical.

The kinetic analysis showing that VIM-12 exhibits narrow substrate specificity was confirmed by *in vivo* experiments

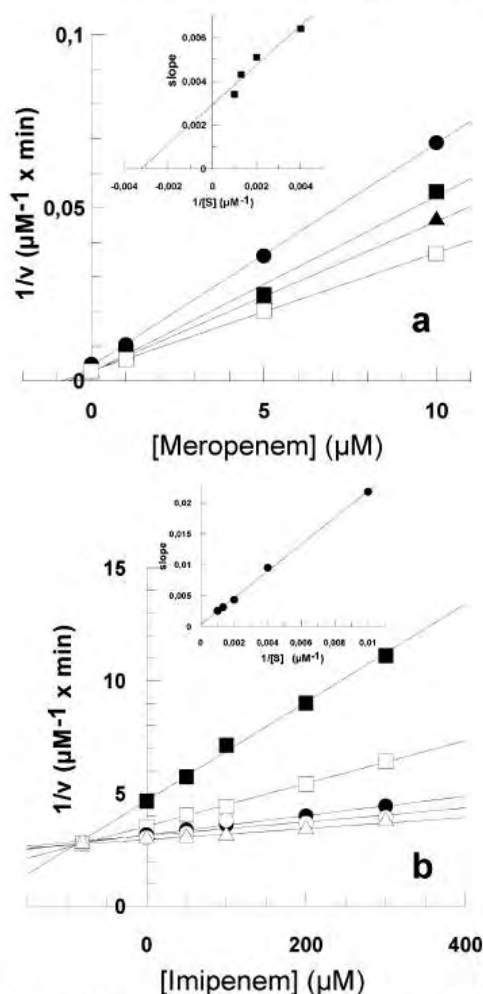


FIGURE 7: (a) Dixon plot of the hydrolysis of penicillin by VIM-12 in the presence of meropenem (MP). The penicillin concentrations were 250 (●), 500 (■), 750 (▲), and 1000  $\mu\text{M}$  (□). The inset is a replot of the slopes of the Dixon lines vs  $1/[\text{penicillin}]$  ( $1/[\text{S}]$ ). (b) Dixon plot of the hydrolysis of penicillin by VIM-12 in the presence of imipenem (IMP). The penicillin concentrations were 100 (■), 250 (□), 500 (●), 750 (○), and 1000  $\mu\text{M}$  (Δ). The inset is a replot of the slopes of the Dixon lines vs  $1/[\text{penicillin}]$  ( $1/[\text{S}]$ ).

that tested the sensitivity of *bla*<sub>VIM-12</sub>-overexpressing *E. coli* strain BL21 against the spectrum of antibiotics that were tested *in vitro*. The MIC values that were observed (Table 2), and in particular the very low MICs for meropenem of the strains that were tested, were consistent with the fact that VIM-12 does not seem to contribute significantly to carbapenem resistance, besides its prominent function of hydrolyzing penicillin (which is the natural substrate). In addition, we tested under the same conditions an *E. coli* clinical isolate that was recently published and encompasses a VIM-12 enzyme. Again, this strain proved to be almost as sensitive as *bla*<sub>VIM-12</sub>-overexpressing strain *E. coli* BL21,



Table 1: Kinetic Parameters of the Purified VIM-12 Metallo- $\beta$ -lactamase, Compared with Those of VIM-1 and VIM-2<sup>a</sup>

enzyme	antibiotic	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1} s^{-1}$ )	$K_i$ ( $\mu M$ )
VIM-12	penicillin	280	34	0.121	—
	imipenem	94	0.028	0.0003	80.6
	meropenem	>1000	<0.01	<10 <sup>-5</sup>	4.2
	ceftazidime	>1000	<0.01	<10 <sup>-5</sup>	728
	aztreonam	>1000	<0.01	<10 <sup>-5</sup>	ND <sup>b</sup>
VIM-1	penicillin	841	29	0.034	ND <sup>b</sup>
	imipenem	1.5	2	1.3	ND <sup>b</sup>
	meropenem	48	13	0.27	ND <sup>b</sup>
	ceftazidime	794	60	0.076	ND <sup>b</sup>
	aztreonam	>1000	<0.01	<10 <sup>-5</sup>	ND <sup>b</sup>
VIM-2	penicillin	49	55.8	1.14	ND <sup>b</sup>
	imipenem	10	9.9	0.99	ND <sup>b</sup>
	meropenem	5	1.4	0.28	ND <sup>b</sup>
	ceftazidime	98	89	0.9	ND <sup>b</sup>
	aztreonam	ND <sup>b</sup>	<0.5	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>

<sup>a</sup> The kinetic data for VIM-1 are from ref 20, and those for VIM-2 are from ref 1. <sup>b</sup> Not determined.

Table 2: Susceptibility Status of Competent Cells with and without *bla*<sub>VIM-12</sub>. Inserts and Other *bla*<sub>VIM-12</sub>-Carrying Strains Tested in This Study<sup>a</sup>

	MIC ( $\mu g/mL$ )				
	IMP	MP	PEN G	ATM	CEF
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	0.25	0.064	> 32	0.047	0.125
DH5 $\alpha$ -VIM-12	0.38	0.094	> 32	0.094	1
<i>E. coli</i> BL21	0.25	0.064	$\geq$ 32	0.016	0.064
BL21-VIM-12	0.38	0.064	> 32	0.023	0.125
Trcs <i>E. coli</i> 26R793 ( <i>bla</i> <sub>VIM-12</sub> )	2	0.5	> 256	4	> 128
<i>E. coli</i> 28 (VIM-12)	1	0.25	> 32	0.5	> 256

<sup>a</sup> Trcs, transconjugant strain; IMP, imipenem; MP, meropenem; PEN G, penicillin G; ATM, aztreonam; and CEF, ceftazidime.

thus consolidating our results about this peculiar behavior of VIM-12 against antibiotics other than penicillin.

## DISCUSSION

The spread of plasmid-encoded MBL genes among opportunistic and pathogenic bacteria, together with the lack of clinically useful inhibitors, is becoming a serious and yet unsolved clinical problem. The recombination system based on integrons and mobile gene cassettes plays a major role in the dissemination of these genes among various pathogens. This study identified the emergence of a novel class B plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-12, anchored by a gene cassette inserted into a class 1 integron from a clinical isolate of *K. pneumoniae*.

VIM-12 is a new member of the VIM lineage, which exhibits narrow substrate specificity, limited to penicillins. The sequence of VIM-12 polypeptide was 97.0 and 93.6% identical with those of VIM-1 and VIM-2, respectively. However, the dendrogram that was produced on the basis of all known VIM protein sequences indicates that VIM12 clusters between VIM-1 and VIM-2 enzymes, which is clearly indicated by the respective sequence alignments (Figure 1). Moreover, VIM-12 bears at its N-terminal region the SGEPS amino acid signature which is characteristic of the VIM-1 lactamases [the corresponding signature for VIM-2 is SVDSS (Figure 1a)]. A possible explanation for the origin of VIM-12 might have been a recombination event

between VIM-1 and VIM-2 that facilitated the anchoring of this novel hybrid VIM-type lactamase in the clinical isolate strain of *K. pneumoniae*, although this hypothesis is difficult to prove and this gene might have also arisen independently. Should *bla*<sub>VIM-12</sub> be an evolutionarily new recombinant gene, it may have not yet acquired its full functional potential. Although the amino acid differences between these enzymes were relatively few in number and located distant from the active site, it seems that they could influence substrate binding, a fact that was partially confirmed in the case of VIM-1 and VIM-2 which, despite their high degree of sequence similarity, exhibit quite different kinetic properties. In terms of structure–function relationships, further research is required to determine the significance of these amino acid changes.

The fact that VIM-12 is limited so far to this specific clinical isolate and the fact that at least its recombinant form that we investigated has limited substrate specificity could support this hypothesis. However, we cannot exclude the possibility that VIM-12 is a novel and genuine MBL that has been elusive so far in many bacterial strains. In fact, a recent report on the identification of the same plasmid-encoded gene in an *E. coli* clinical isolate (*E. coli* strain 28, recovered February 2006 in Thessaloniki, Greece) (44) indicates that either VIM-12 already started to spread among Gram-negative bacteria or it has been elusive so far among clinical isolates and its identification requires further investigation. Nevertheless, the amino acids that configure the active site of VIM-12 were identical with those encountered in all VIM active sites (48). In addition, all the amino acid residues that have been reported to play important role in Zn<sup>2+</sup> binding (48, 49) were present in the VIM-12 sequence, including an asparagine at position 120 that, as recently reported, places Zn<sup>2+</sup> for optimal MBL activity. Taking into account this structural similarity of the active site of VIM-12 when compared to the available structural data for VIM-2 (PDB entries 1KO2 and 1KO3), we would expect similar substrate hydrolysis profiles. However, recent studies have proposed that besides the conserved residues that seem to participate in Zn<sup>2+</sup> coordination in MBLs, the active site is probably modulated by a hydrogen bonding network of residues located along the MBLs' primary structure (48). The fact that the kinetic properties of VIM-12 were found to be atypical compared to those of other VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases raises the question of whether the N-terminal and C-terminal residues that exhibit homology with residues in VIM-1 and VIM-2, respectively, could contribute in such a bonding network that results in this atypical specificity of VIM-12. This hypothesis requires further experimentation with extensive mutational analysis and support by crystallographic data. All other lactamases of this group hydrolyze most  $\beta$ -lactam compounds, except aztreonam, far more effectively.

A reason that cannot be excluded when we try to explain the ability of VIM-12 to efficiently hydrolyze only penicillin is the stereochemistry of the antibiotics that were used in this study (Figure 2). All of them were synthetic derivatives of penicillin bearing different side groups and a lactamic ring in the opposite direction. However, imipenem bears a rather flexible side chain that could facilitate binding to the active site and efficient, albeit slower, hydrolysis. On the other hand, meropenem contains bulky rings that contribute to a less



## Characterization of VIM-12 Substrate Specificity

flexible overall structure. This structural difference could explain why this antibiotic is not suitable for correct recognition and processing by VIM-12, although it has been reported as an appropriate substrate for other VIM-type lactamases. Interestingly, it seems that VIM-12 contains allosteric sites for binding of meropenem (and possibly for ceftazidime and other antibiotics that were not tested in this study) and these sites favor inactivation of VIM-12 in a noncompetitive mode, something that has never been reported before for VIM-type lactamases. If we assume VIM-12 is a rather new entry in the expanding family of MBLs, then this enzymatic behavior appears to be quite reasonable, from an evolutionary point of view. Nevertheless, the fact that the *K. pneumoniae* clinical isolate that encompasses this enzyme with limited ability to hydrolyze lactam antibiotics exhibits at the same time remarkable antibiotic resistance points toward the possibility that this organism possibly possesses alternative mechanisms against antibiotic action (such as a different porin profile, different penicillin binding proteins, or different antibiotic efflux pumps) that require further investigation.

The individual kinetic parameters of VIM-12 are listed in Table 1. Aztreonam was not hydrolyzed by VIM-12, a fact consistent with the behavior of all VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases. In addition, we could not observe any detectable hydrolysis of ceftazidime, cefotaxime, and cefotaxin either in vitro or in vivo. Finally, only slow hydrolysis of imipenem was detected, but not of meropenem. The very low imipenem hydrolytic efficiency of VIM-12 compared with those of other VIM-type lactamases resulted from a combination of a relatively higher  $K_m$  value with an extremely low turnover rate (Table 1).

The competition experiments that were conducted to clarify the mode of recognition of these  $\beta$ -lactam compounds from the VIM-12 enzyme showed that quite low  $K_i$  values were determined with carbapenems, especially in the case of meropenem, despite the lack of its hydrolysis. The detailed kinetic analysis showed that imipenem acts as competitive inhibitor, as expected, with respect to the fact that imipenem represents a true substrate of VIM-12 and not a dead-end competitive inhibitor. It also important to mention that the kinetic analysis presented in this study is supportive of the observation that this competitive inhibition comes as a result of displacement of penicillin from the active site of VIM-12, rather than a competitive binding from the accumulation of hydrolysis product. Although this latter effect cannot be entirely excluded, all the competition experiments that we performed point toward the first possibility.

On the other hand, meropenem cannot be hydrolyzed but can bind the enzyme acting as a noncompetitive inhibitor. This observation is indicative of the possible presence in the enzyme structure of an allosteric site that facilitates the binding of this antibiotic. Interestingly, the decrease in susceptibility to carbapenems conferred by VIM-12 in *K. pneumoniae* and its transformant, although not very high, is significant, strongly supporting as we mentioned above the possibility that additional mechanisms are responsible for this resistance. This finding is also supported by the very low meropenem MIC (0.25  $\mu\text{g/mL}$ ) of the *bla*<sub>VIM-12</sub>-bearing clinical isolate *Escherichia coli* 28 (Table 2). Nevertheless, in view of the kinetic data shown, the inhibitory effect of carbapenems on this enzyme might play a role in determining

Biochemistry, Vol. 46, No. 45, 2007 13177

in the future antibiotic combinations capable of synergistically improving the treatment of nosocomial infections.

From the results of this study, we conclude that VIM-12 is the first of a new subgroup of class B1 metallo- $\beta$ -lactamases to emerge in *K. pneumoniae*. Its biochemical properties further underscore the notion that considerable functional and structural diversity can be encountered among class B  $\beta$ -lactamases. Additional investigation of enzymes of this class, which are becoming increasingly clinically important, will contribute to the understanding of the mechanistic properties which remain poorly understood.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Leonidas S. Tzouveleakis for helpful discussions and Stamatina Giannouli and Zoi Karoulia for suggestions, technical help, and encouragement.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Optimization of VIM-12 activity assay conditions. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

- Poirer, L., and Nordmann, P. (2002) Acquired carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases and their genetic support, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3, 117–127.
- Ambler, R. P. (1980) The structure of  $\beta$ -lactamases, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 289, 321–331.
- Fisher, J. F., Meroueh, S. O., and Mobashery, S. (2005) Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity, *Chem. Rev.* 105, 395–424.
- Carfi, A., Pares, S., Duee, E., Galleni, M., Duez, C., Frere, J. M., and Dideberg, O. (1995) The 3-D structure of a zinc metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold, *EMBO J.* 14, 4914–4921.
- Fabiane, S. M., Sohi, M. K., Wan, T., Payne, D. J., Bateson, J. H., Mitchell, T., and Sutton, B. J. (1998) Crystal structure of the zinc-dependent  $\beta$ -lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å resolution: Binuclear active site with features of a mononuclear enzyme, *Biochemistry* 37, 12404–12411.
- Concha, N. O., Janson, C. A., Rowling, P., Pearson, S., Cheever, C. A., Clarke, B. P., Lewis, C., Galleni, M., Frere, J. M., Payne, D. J., Bateson, J. H., and Abdel-Meguid, S. S. (2000) Crystal structure of the IMP-1 metallo  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: Binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor, *Biochemistry* 39, 4288–4298.
- Fast, W., Wang, Z., and Benkovic, S. J. (2001) Familial mutations and zinc stoichiometry determine the rate-limiting step of nitrocefin hydrolysis by metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*, *Biochemistry* 40, 1640–1650.
- Cameron, A. D., Ridderstrom, M., Olin, B., and Mannervik, B. (1999) Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thioester substrate analogue, *Structure* 7, 1067–1078.
- Frazão, C., Silva, G., Gomes, C. M., Matias, P., Coelho, R., Sieker, L., Macedo, S., Liu, M. Y., Oliveira, S., Teixeira, M., Xavier, A. V., Rodrigues-Pousada, C., Carrondo, M. A., and Le Gall, J. (2000) Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas*, *Nat. Struct. Biol.* 7, 1041–1045.
- Gomes, C. M., Frazão, C., Xavier, A. V., Legall, J., and Teixeira, M. (2002) Functional control of the binuclear metal site in the metallo- $\beta$ -lactamase-like fold by subtle amino acid replacements, *Protein Sci.* 11, 707–712.
- Schilling, O., Wenzel, N., Naylor, M., Vogel, A., Crowder, M., Makaroff, C., and Meyer-Klaucke, W. (2003) Flexible metal binding of the metallo- $\beta$ -lactamase domain: Glyoxalase II incorporates iron, manganese, and zinc in vivo, *Biochemistry* 42, 11777–11786.
- Spencer, J., Clarke, A. R., and Walsh, T. R. (2001) Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic  $\beta$ -lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo- $\beta$ -lactamase, *J. Biol. Chem.* 276, 33638–33644.



13. Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frere, J. M., and Dideberg, O. (2005) A metallo- $\beta$ -lactamase enzyme in action: Crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.* 345, 785–795.
14. Wommer, S., Rival, S., Heinz, U., Galleni, M., Frere, J. M., Franceschini, N., Amicosante, G., Rasmussen, B., Bauer, R., and Adolph, H. W. (2002) Substrate-activated zinc binding of metallo- $\beta$ -lactamases: Physiological importance of mononuclear enzymes. *J. Biol. Chem.* 277, 24142–24147.
15. Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Frere, J. M. (1998) Catalytic properties of class A  $\beta$ -lactamases: Efficiency and diversity. *Biochem. J.* 330, 581–598.
16. Rasmussen, B. A., and Bush, K. (1997) Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 223–232.
17. Hall, B. G., Salipante, S. J., and Barlow, M. (2003) The metallo- $\beta$ -lactamases fall into two distinct phylogenetic groups. *J. Mol. Evol.* 57, 249–254.
18. Hall, B. G., Salipante, S. J., and Barlow, M. (2004) Independent origins of subgroup B1 + B2 and subgroup B3 metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Mol. Evol.* 59, 133–141.
19. Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., and Kato, N. (1994) Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 71–78.
20. Franceschini, N., Caravelli, B., Docquier, J. D., Galleni, M., Frere, J. M., Amicosante, G., and Rossolini, G. M. (2000) Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3003–3007.
21. Castanheira, M., Toleman, M. A., Jones, R. N., Schmidt, F. J., and Walsh, T. R. (2004) Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4654–4661.
22. Murphy, T. A., Simm, A. M., Toleman, M. A., Jones, R. N., and Walsh, T. R. (2003) Biochemical characterization of the acquired metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 582–587.
23. Livermore, D. M., and Woodford, N. (2000) Carbapenemases: A problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 489–495.
24. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2005) Metallo- $\beta$ -lactamases: The quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 306–325.
25. Lauretti, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., and Rossolini, G. M. (1999) Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1584–1590.
26. Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J. D., and Nordmann, P. (2000) Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 891–897.
27. Toleman, M. A., Rolston, K., Jones, R. N., and Walsh, T. R. (2004) blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 329–332.
28. Pournaras, S., Tsakris, A., Maniatis, M., Tzouvelekis, L. S., and Maniatis, A. N. (2002) Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo- $\beta$ -lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 4026–4028.
29. Bahar, G., Mazzariol, A., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R., Rossolini, G. M., and Cornaglia, G. (2004) Detection of VIM-5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 282–283.
30. Pasteran, F., Faccone, D., Petroni, A., Rapoport, M., Galas, M., Vazquez, M., and Procopio, A. (2005) Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- $\beta$ -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 474–475.
31. Yan, J. J., Hsueh, P. R., Ko, W. C., Luh, K. T., Tsai, S. H., Wu, H. M., and Wu, J. J. (2001) Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2224–2228.
32. Koh, T. H., Wang, G. C., and Sng, L. H. (2004) IMP-1 and a novel metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2334–2336.
33. Crespo, M. P., Woodford, N., Sinclair, A., Kaufmann, M. E., Turton, J., Glover, J., Velez, J. D., Castaneda, C. R., Recalde, M., and Livermore, D. M. (2004) Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- $\beta$ -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5094–5101.
34. Walsh, T. R. (2005) The emergence and implications of metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 2–9.
35. Giakkoupi, P. A., Xanthaki, M., Kanelopoulou, A., Vlahaki, V., Miriagou, S., Kontou, E., Papafragas, H., Malamou-Lada, H., Tzouvelekis, L. S., Legakis, N. J., and Vatopoulos, A. C. (2003) VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3893–3896.
36. Jeong, S. H., Lee, K., Chong, Y., Yum, J. H., Lee, S. H., Choi, H. J., Kim, J. M., Park, K. H., Han, B. H., Lee, S. W., and Jeong, T. S. (2003) Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 397–400.
37. Miriagou, V., Tzelepi, E., Gianneli, D., and Tzouvelekis, L. S. (2003) *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 395–397.
38. Tsakris, A. S., Pournaras, N., Woodford, M. F., Palepou, I., Babini, G. S., Douboyas, J., and Livermore, D. M. (2000) Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1290–1292.
39. Lee, K., Ha, G. Y., Shin, B.-M., Kim, J. J., Kang, J. O., Jang, S. J., Yong, D., and Chong, Y. [The Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance (KONSAR) group] (2004) Metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli in Korean nationwide surveillance of antimicrobial resistance group hospitals in 2003: Continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50, 51–58.
40. Nordmann, P., and Poirel, L. (2002) Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 321–331.
41. Pournaras, S., Maniatis, M., Petinaki, E., Tzouvelekis, L. S., Tsakris, A., Legakis, N. J., and Maniatis, A. N. (2003) Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- $\beta$ -lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1409–1414.
42. Docquier, J. D., Lamotte-Brasseur, J., Galleni, M., Amicosante, G., Frere, J. M., and Rossolini, G. M. (2003) On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 257–266.
43. Pournaras, S., Ikonomidis, A., Tzouvelekis, L. S., Tokatlidou, D., Spanakis, N., Maniatis, A. N., Legakis, N. J., and Tsakris, A. (2005) VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 5153–5156.
44. Ikonomidis, A., Labrou, M., Afkous, Z., Maniatis, A. N., Sofianou, D., Tsakris, A., and Pournaras, S. (2007) First occurrence of an *Escherichia coli* clinical isolate producing the VIM-1/VIM-2 hybrid metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* (in press).
45. Leatherbarrow, R. J. (2001) *GraFit*, version 5, Erithacus Software Ltd., Horley, UK.
46. Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G. M., Spencer, J., Dideberg, O., and Frere, J. M. (2001) Metallo- $\beta$ -lactamases Working Group. Standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 660–663.
47. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
48. Murphy, T. A., Catto, L. E., Halford, S. E., Hadfield, A. T., Minor, V., Walsh, T. R., and Spencer, J. (2006) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 provides insights into variable zinc affinity of metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Mol. Biol.* 357, 890–903.
49. Garau, G., Garcia-Saez, I., Bebrone, C., Anne, C., Mercuri, P., Galleni, M., Frere, J. M., and Dideberg, O. (2004) Update of the standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2347–2349.

BI701258W